

Contribution a l'etude du fibrinogene, de la fibrinoformation, de la fibrinolyse par l'utilisation d'anticorps monoclonaux

Citation for published version (APA):

Mirshahi, M. (1984). *Contribution a l'etude du fibrinogene, de la fibrinoformation, de la fibrinolyse par l'utilisation d'anticorps monoclonaux*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19841123mm>

Document status and date:

Published: 01/01/1984

DOI:

[10.26481/dis.19841123mm](https://doi.org/10.26481/dis.19841123mm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU FIBRINOGENE, DE LA FIBRINOFORMATION,
DE LA FIBRINOLYSE PAR L'UTILISATION
D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU FIBRINOGENE, DE LA FIBRINOFORMATION,
DE LA FIBRINOLYSE PAR L'UTILISATION
D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van Doctor in de Geneeskunde,
aan de Rijksuniversiteit Limburg te Maastricht, op gezag van
de Rector Magnificus, Prof.Dr. H.C. Hemker, volgens het
besluit van het College van Dekanen, in het openbaar te
verdedigen op vrijdag, 23 november 1984 om 16.00 uur

door

Massoud Mirshahi
geboren te Nishabour in Iran.

Promotor: Prof.Dr. H.C. Hemker.

Referenten: Prof.Dr. C. Soria, Université de Rouen, Frankrijk.
Prof.Dr. H.A.J. Lemmens.

Het drukken van dit proefschrift werd mogelijk gemaakt door
subsidies van:
De Stichting Wetenschappelijk Onderwijs Limburg,
De Stichting ter Bevordering van Wetenschappelijk Onderwijs en
Onderzoek en Gezondheidszorgverlening te Maastricht.

A tous les membres de ma famille

C'est grâce à eux que j'ai pu poursuivre
mes études en toute sérénité.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma grande
affection et qu'ils me permettent de leur
dédier à tous cette thèse.

A Monsieur le Professeur H.C.HEMKER

Vous m'avez fait un grand honneur de me compter
parmi vos élèves et d'avoir accepté de juger ce
travail.Qu'il me soit permis de vous exprimer
ma respectueuse admiration pour tous les
travaux que vous réalisez concernant la biochimie
de l'Hémostase et ma profonde gratitude pour
l'intérêt que vous avez bien voulu accorder
à cette étude.

A Mademoiselle le Docteur J. SORIA

A Mademoiselle le Professeur C. Soria et

A Monsieur le Docteur C. BOUCHEIX

Qui ont inspiré le travail de cette thèse et qui en
ont assuré la réalisation en me guidant sans relâche.
De leur dois tout ce travail et ma formation de
chercheur.

Je les remercie de leur grande disponibilité, de leur
bienveillance et de leur aide amicale de chaque instant.
Les liens qui nous unissent ne sont pas seulement ceux
d'un conseiller à leur élève, mais aussi et surtout des
liens d'amitié.

Je les remercie de leur gentillesse, de leur simplicité
et de la grande qualité des conseils qu'ils m'ont
prodigués et c'est un honneur pour moi de les compter
au nombre de mes amis.

A Monsieur le Professeur A. BERNADOU

Que je remercie de m'avoir accueilli avec grande
bienveillance dans son laboratoire où il m'a
permis de réaliser cette thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma
respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J.P. FAURE

Qui m'a accueilli dans le laboratoire
d'Ophtalmologie de l'Hôtel-Dieu, qui m'a
consacré généreusement son temps et n'a cessé
de me prodiguer de précieux conseils et de
me faire profiter de son expérience dans le
domaine de l'immunologie.

Je le prie de trouver ici le témoignage de
ma parfaite reconnaissance.

A Monsieur le Docteur C. ROSENFELD et

A Messieurs les Professeur J.P. CAEN et M. SAMAMA

Je les remercie pour la qualité de leur enseignement, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont manifesté au sein de leur service.

Je leur exprime toute ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Docteur J.Y. PERROT et

A Mademoiselle GIANONNI

Ils m'ont permis de réaliser cette thèse
dans une atmosphère confiante et amicale.
Je les remercie de leur amitié.

A Monsieur le Professeur Y. POULIQUEN

Qui m'a fait l'honneur de m'accepter dans
son service de l'Hôtel-Dieu.

Il a bien voulu me prodiguer ses conseils et
ses encouragements.

Je l'en remercie et l'assure de ma
reconnaissance et de mon respect.

A Madame Martine BEDU

Que je tiens tout particulièrement à
remercier pour avoir participé avec
beaucoup de compétence et grande
gentillesse à l'édition de ce travail.

SOMMAIRE

- Introduction	1
- Chapitre I : Données actuelles sur l'hybridation.	
Rappel sur la structure et la fonction du fibrinogène	3
Historique du développement de la technique d'hybridations cellulaires	4
Rappel sur le fibrinogène	11
I- Structure du fibrinogène	11
A : Structure tertiaire	11
B : Structures primaire et secondaire	13
Produits de dégradation du fibrinogène par le bromure de cyanogène	14
Chaines du fibrinogène	16
Sites de fixation du calcium	18
II- Biosynthèse du fibrinogène	19
III- Catabolisme du fibrinogène	22
IV La fibrinoformation	23
V Rappel sur la dégradation du fibrinogène et de la fibrine par la plasmine	30
VI Etude immunochimique de la molécule de fibrinogène	41
A : Les différents épitopes localisés dans la molécule de fibrinogène	42
B : Modèles proposés pour expliquer l'apparition de néo-antigènes	50
C : Application de l'analyse immuno chimique du fibrinogène à l'étude de la structure tertiaire de la molécule	51
- Chapitre II : Matériel et méthodes	56
I - Préparation d'un anticorps monoclonal	57
A- Préparation des produits de dégradation de la fibrine	57
B- Immunisation des souris	57
C- Protocole de fusion	57
D- Préservation de clones	60
E- Préparation des ascites	60

II - Méthodes utilisées pour la sélection des lignées	62
A : Principe de la méthode immuno enzymologique	62
B : Matériel	
Support solide	64
Antigènes utilisés	64
Fibrinogène humain	
Fragments de dégradation du fibrinogène	
Produits de dégradation de la fibrine	
Chaines isolées du fibrinogène	
Monomères des A et des B de fibrine	
IgG isolées à partir d'un anti serum	68
IgG marquées à la peroxydase	68
C : Protocole opératoire	70
1 - Immobilisation de l'antigène sur la plaque de polystyrène	70
2 - Réaction antigène-anticorps	72
III - Méthode immuno enzymologique utilisée pour étudier la réactivité de l'anticorps monoclonal vis à vis de l'antigène en solution	74
A: Principe de la réaction	74
B: Matériel	74
C : Protocole	74
1 - détermination de la dilution d'anticorps à utiliser	76
2 - Étape de compétition entre antigène soluble et antigène immobilisé pour se lier à l'anticorps	76
IV - Méthode utilisée pour juger de la réactivité des anticorps vis à vis des autre protéines plasmatiques	78
V Détermination de la classe des IgG	79
- Chapitre III Résultats	80
I - Classification et 1 ère selection des hybrides	81
II Réactivité des anticorps selectionnes et clonés vis à vis de l'antigène en solution	82
A : Détermination de la dilution du surnageant	82
B Réactivité du fibrinogène ,des complexes de dégradation de la fibrine et des produits de dégradation du fibrinogène vis à vis des anticorps monoclonaux	83

Etude des anti D complets	85
Anticorps réagissant avec le fibrinogène et le fragment D	85
Anticorps réagissant avec le fibrino- gène immobilisé mais non avec le fibrinogène en solution	87
Etude des anti D néo	90
Etude comparée de la réactivité des anticorps vis à vis des fragments D1 et D3	91
Etude des anti E	93
III - Réactivité des différents anticorps vis à vis des chaînes dissociées du fibrinogène	94
IV Réactivité des anticorps vis à vis des autres protéines plasmatiques	96
V Détermination de la classe des Ig	96
Chapitre IV Discussion des résultats	97
I Anticorps réagissant sur le fibrinogène et le fragment D ou E	98
A - Anticorps réagissant avec le fibrinogène et le fragment D	100
B - Anticorps réagissant avec le fibrinogène et le fragment E	102
II Anticorps ne réagissant pas avec le fibrinogène intact mais avec le fragment D	103
A Anti D néo anticorps	103
B Anticorps de conformation	107
III Comparaison avec les autres anticorps décrits dans la littérature	109
Chapitre V Applications des anticorps monoclonaux sélectionnés	
Etude analytique de l'interaction entre les différents monomères par utilisation d'anti D néo anticorps. Application à l'étude des troubles de l'agréation des monomères.	115

I	Mise au point d'une technique d'étude de l'interaction monomères-fragment D1	116
A	- Principe de la technique	117
B	- Matériel et méthodes	117
C	- Résultats	120
D	- Discussion	122
II	Application de la méthode	125
A	- Etude pharmacologique de certaines substances inhibant l'agrégation des monomères. Détermination de leur réactivité	125
B	- Application particulière à l'étude d'un fibrinogène anormal homozygote, le fibrinogène Ales. Mise en évidence d'une anomalie du site de polymérisation "a" localisée sur la chaîne gamma	125
	1. Matériel et méthode	126
	2. Résultats	130
	3. Discussion	140
	Dosage des produits de dégradation de la fibrine ou du fibrinogène directement dans le plasma	143
I	Rappel des techniques utilisées actuellement en biologie clinique	143
A	- Méthodes basées sur une réaction antigène-anticorps	143
B	- Le staphylo clumping test	144
II	Techniques de dosage des produits de dégradation de la fibrine par utilisation d'anticorps monoclonaux anti D-néo	146
A	- Technique immuno-enzymologique de Rylatt et al.	146
B	- Technique personnelle au latex	147
	1. Principe	147
	2. Matériel et méthodes	147
	3. Résultats	150
	4. Discussion	150
	- Conclusion	156
	- Bibliographie	

Quand il y a une brèche vasculaire, le fibrinogène, protéine soluble, est attaqué par la thrombine générée, aboutissant à la formation de monomères de fibrine qui spontanément s'agrègent pour donner naissance au caillot de fibrine destiné à colmater cette brèche.

Les thromboses ou les coagulations intravasculaires sont des processus pathologiques résultant d'une activation de la coagulation. La fibrine ainsi formée n'est pas destinée à colmater une brèche vasculaire, mais obstrue la microcirculation. Un processus réactionnel de dégradation de ces caillots, ou fibrinolyse, est alors déclenché, visant à reperméabiliser les vaisseaux. La dégradation de ces caillots est principalement assurée par la plasmine, qui résulte d'une activation locale, in situ, au niveau du caillot, du plasminogène. La fibrine est alors dégradée en produits de dégradation de la fibrine et la présence de ces dérivés dans le sang circulant témoigne donc de la présence d'un caillot de fibrine dans la circulation.

Le début de notre travail a été de préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de la molécule de fibrinogène ou de ses dérivés. L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre des néo-antigènes masqués dans la molécule du fibrinogène native, mais démasqués dans certaines circonstances (telle la dégradation de la molécule de fibrinogène par la plasmine ou sa fixation sur un support solide) nous a permis :

- 1) d'apporter certaines informations concernant la structure tertiaire de la molécule de fibrinogène et de mettre en évidence certains changements conformationnels induits par la fixation du

fibrinogène sur un support solide ;

2) de réaliser le dosage des produits de dégradation de la fibrine en présence de fibrinogène, donc directement dans le plasma ;

3) d'évaluer avec précision et de façon analytique l'agrégation des monomères de fibrine, permettant ainsi de juger de l'efficacité de certaines drogues agissant à ce niveau.

En outre, l'utilisation de tels anticorps monoclonaux nous a permis de localiser dans un fibrinogène anormal l'anomalie au niveau d'un site de polymérisation des monomères. L'étude d'un tel fibrinogène est donc très utile en vue de déceler la nature exacte de ce site de polymérisation, qui n'est pas encore déterminé.

CHAPITRE I

DONNEES ACTUELLES SUR L'HYBRIDATION

RAPPELS SUR LA STRUCTURE ET LA FONCTION DU FIBRINOGENE

HISTORIQUE DU DEVELOPPEMENT DE LA TECHNIQUE
D'HYBRIDATIONS CELLULAIRE

En 1960, Georges BARSKI et ses collaborateurs (6) démontrèrent à Paris que le virus de Sendai inactivé pouvait amener deux cellules de souris différentes à fusionner pour former une cellule hybride ayant les propriétés des deux cellules parentales. Cette expérience fondamentale montrant que le virus de Sendai pouvait engendrer des cellules à plusieurs noyaux, allait être à la base de la technique d'hybridation cellulaire. La formation de ces dernières à la suite d'une fusion entre cellules somatiques était connue depuis déjà plusieurs années. Elle remontait en fait à l'apparition du microscope optique, quand les biologistes avaient observé l'apparition de cellules géantes à plusieurs noyaux dans les tissus épithéliaux infectés par les virus de la variole, de la varicelle, de l'herpès simple et d'autres encore. Mais en montrant qu'un virus pouvait être réellement la cause d'une fusion cellulaire, l'expérience de Barski donnait un moyen de contrôler la formation des hybrides. En cinq ans une technologie était forgée pour induire la fusion de cellules animales et pour sélectionner les lignées engendrées par la division (clonale) indéfinie de certaines cellules hybrides.

Quelques années plus tard, l'intérêt de ces travaux était confirmé, notamment par les possibilités qu'ils offraient de construire une carte chromosomique, en particulier humaine, et d'analyser certains aspects de régulations mis en oeuvre dans les processus de différenciation cellulaire.

Pour isoler les clones hybrides nouvellement formés, on cultive habituellement le mélange de cellules dans un milieu spécial qui permet aux cellules hybrides de pousser, alors qu'il tue les cellules parentales non fusionnées, un tel milieu est appelé milieu sélectif.

John Littlefield (117), en 1964, alors à la Harvard Medical School, a mis au point un milieu sélectif pour sélectionner une des cellules hybrides résultant de la fusion de cellules de souris (LMTK) dépourvues de thymidine kinase (TK) et de cellules de souris (A9) dépourvues d'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). Ce milieu sélectif contient, outre tous les composants nutritifs essentiels, de l'aminoptérine. Cette drogue bloque la synthèse de l'acide folique nécessaire à la production des précurseurs du DNA. Les cellules peuvent synthétiser ces précurseurs en présence d'aminoptérine, si d'autres précurseurs du DNA sont présents, tels l'hypoxanthine et la thymidine. C'est pourquoi ce milieu spécial est appelé milieu HAT (H = Hypoxanthine, A = Aminoptérine et T = Thymidine) (figure 1).

Dans le milieu HAT, les cellules parentales, qui n'ont pas fusionné et qui sont déficientes en enzymes HGPRT et TK, meurent car elles ne peuvent utiliser l'hypoxanthine et la thymidine pour la synthèse du DNA.

En revanche, les cellules LMTK et A9 étant dépourvues en enzymes différentes (TK pour LMTK et HGPRT pour A9), les cellules hybrides renferment les deux enzymes et peuvent donc utiliser les sources exogènes des précurseurs du DNA pour la synthèse de ce dernier.

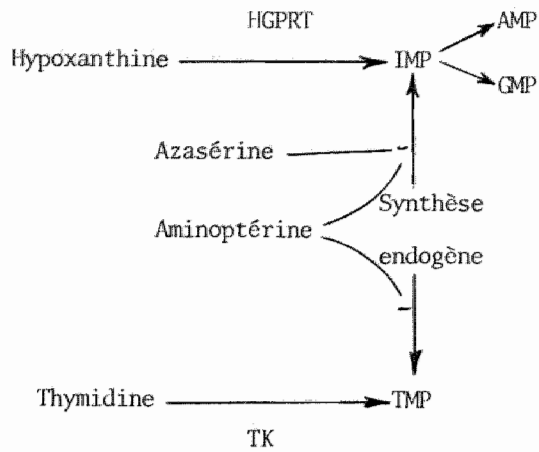


Figure 1 : Synthèse des précurseurs de l'ADN
en présence ou en l'absence d'aminoptérine.

Ainsi un clone hybride peut proliférer pour former une colonie visible de quelques milliers de cellules que l'on peut facilement isoler et mettre en culture, afin d'obtenir une population cellulaire importante pour les analyses biochimiques et chromosomiques. Après avoir fusionné des cellules de souris de différentes lignées, des expériences ideniques de fusion ont été réalisées entre cellules humaines et cellules de souris LMTK ou A9. Pour ces expériences on utilise généralement des leucocytes ou des fibroblastes humains qui proviennent de prélèvement de la peau. Ces cellules possèdent normalement des enzymes HGPRT et TK, alors qu'il font défaut aux lignées A9 et LMTK respectivement. Les hybrides résultant de la fusion homme x souris sont donc complémentés en TK ou HGPRT, ainsi LMTK et A9 meurent, par contre, les hybrides homme x souris prolifèrent dans ce milieu, car les enzymes déficientes de la souris LMTK ou A9 sont complémentées par les enzymes humains. Quant aux fibroblastes humains parentaux, ils poussent plus lentement que les hybrides et sont finalement éliminés. Les hybrides ainsi obtenus possèdent au départ un double stock chromosomique (celui de la cellule humaine et celui de la souris). Mais ils perdent par la suite certains de leurs chromosomes, ce qui permet d'attribuer aux chromosomes restant les fonctions qui persistent. Plus précisément, B.R. MIGEON (135) et C.S. MILLER de la John Hopkins Medical School, montrèrent que les hybrides issus de la fusion de cellules de souris et de cellules humaines avaient tendance à perdre les chromosomes humains et non ceux de souris. Certains de ces hybrides sélectionnés et cultivés dans le milieu HAT perdaient finalement tous les chromosomes humains à l'exception du chromosome 17 ; leur survie montrait que ce chromosome 17 complémentait la déficience en TK des cellules de souris LMTK : les hybrides qui

perdaient par la suite le chromosome 17 devenaient sensibles à l'action létale de l'aminoptérine. Sur la base de ces observations, on a pu attribuer au chromosome 17 le gène humain codant pour TK et avec la même technique on a montré que le gène humain codant pour l'HGPRT était localisé sur le chromosome X.

La découverte de Köhler et Milstein en 1975 (107) sur le fait que l'hybridation cellulaire entre des lymphocytes de souris hyperimmunisée et des cellules myélomateuses de souris permettait de produire en quantité indéfinie des anticorps monoclonaux de spécificité très déterminée, a attiré l'attention d'une large communauté scientifique. Cette technologie nouvelle est susceptible de résoudre un problème crucial de l'immunologie : l'obtention d'anticorps monospécifiques strictement homogènes.

Hybridation et production d'anticorps monoclonaux

La synthèse des anticorps est assurée par une catégorie de globules blancs (lymphocytes B) qui au terme de leur évolution cellulaire sont appelés plasmocytes. Ils excrètent les anticorps dans le sérum.

Classiquement, pour obtenir un anticorps spécifique d'un antigène donné, on immunise un animal (lapin, chèvre, mouton, souris) en lui injectant pendant plusieurs semaines une préparation de l'antigène plus ou moins purifié, la présence dans son organisme d'une substance étrangère déclenche la réponse immunitaire.

Lorsqu'une molécule d'antigène portant plusieurs déterminants antigéniques pénètre dans le corps d'un animal, cette intrusion entraîne la prolifération de plusieurs lignées de lymphocytes B qui

sécrètent chacun une molécule d'anticorps dirigée contre un déterminant antigénique (ou épitope). Un antisérum conventionnel contient un mélange de ces anticorps. On obtient des anticorps monoclonaux en faisant fusionner des lymphocytes de la rate avec des cellules de myélome. Les cellules hybrides sont ensuite clonées et chacun des clones sécrète une anticorps monoclonal adapté spécifiquement à un seul déterminant antigénique de la molécule d'antigène (Figure 2).

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par la méthode habituelle (décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes) par fusion, à l'aide du polyéthylène-glycol, de cellules spléniques d'une souris (ou d'un rat) immunisée et de cellules d'un myélome de souris (NS1 ou SP2...) ou d'un myélome de rat (FR...). Les hybrides sont sélectionnés sur milieu HAT. On mesure l'activité des anticorps sécrétés dans le milieu et on congèle par précaution un échantillon de chaque culture positive. Les hybrides sécrétant un anticorps sont clonés et l'activité de chaque clone est mesurée. Une partie de ceux qui donnent un résultat positif est congelée, une autre est reclonée. Le type d'immunoglobuline produit est caractérisé. Les clones retenus définitivement peuvent être gardés congelés. Lorsqu'un clone est décongelé on peut produire l'anticorps, soit en mettant les cellules en culture, soit en les injectant à des animaux pour induire des ascites (28).

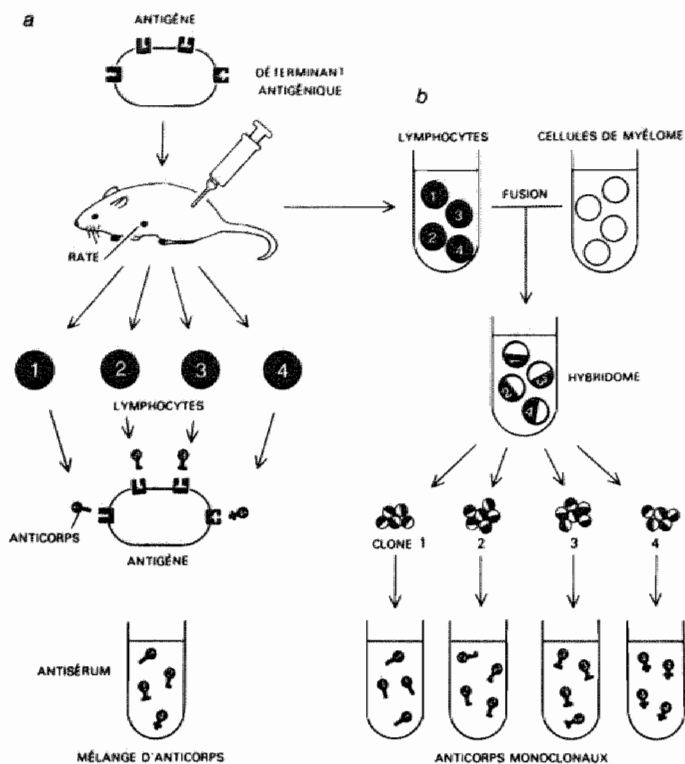


Fig. 2 : Schéma d'hybridation cellulaire et d'obtention d'anticorps monoclonaux.
(d'après Milstein. Pour la Science 1980)

RAPPEL SUR LE FIBRINOGENE

I. STRUCTURE DU FIBRINOGENE

A. STRUCTURE TERTIAIRE

L'étude de la structure du fibrinogène a fait l'objet de nombreux travaux. Le fibrinogène est une protéine allongée, de poids moléculaire 340.000 et composée de 3 nodules réunis par des filaments enroulés en hélices de 150 Å de long et de 12 Å de diamètre (Fig. 3). Le nodule central a un diamètre de 50 Å, tandis que les 2 nodules latéraux ont un diamètre de 60 Å. De chaque nodule latéral s'échappe un fragment de chaîne protéique. En fait cette structure trinodulaire est très flexible et selon les conditions expérimentales la protéine peut être plus ou moins repliée (81, 55).

Doolittle (44) montre 4 régions principales dans le fibrinogène :

- le domaine central contenant l'extrémité N terminal des 6 chaînes polypeptidiques
- les structures hélicoïdales
- les 2 domaines latéraux
- les fragments de chaînes alpha formant des appendices sortant des deux domaines latéraux.

La dégradation enzymatique du fibrinogène par la plasmine se fait en des endroits précis de cette molécule qui sont compatibles avec le schéma trinodulaire de la protéine (65, 124).

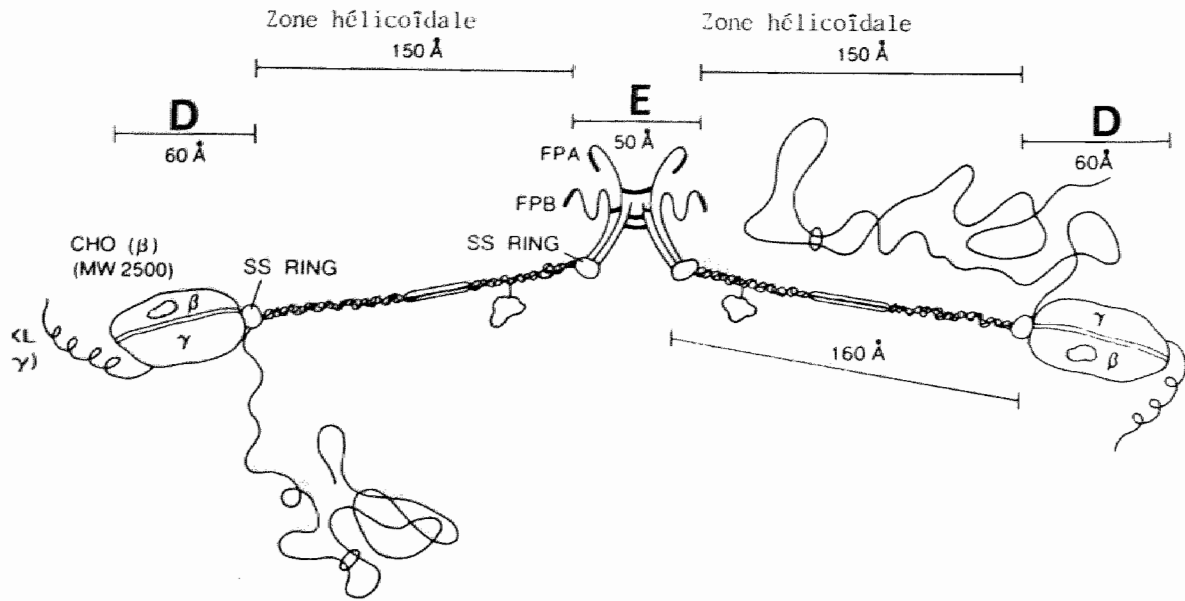


Fig. 3 : Structure tertiaire de la molécule de fibrinogène.
(d'après Doolittle, Watt et Cottrell
in Versatility of proteins, Academic Press, 1978, 393).

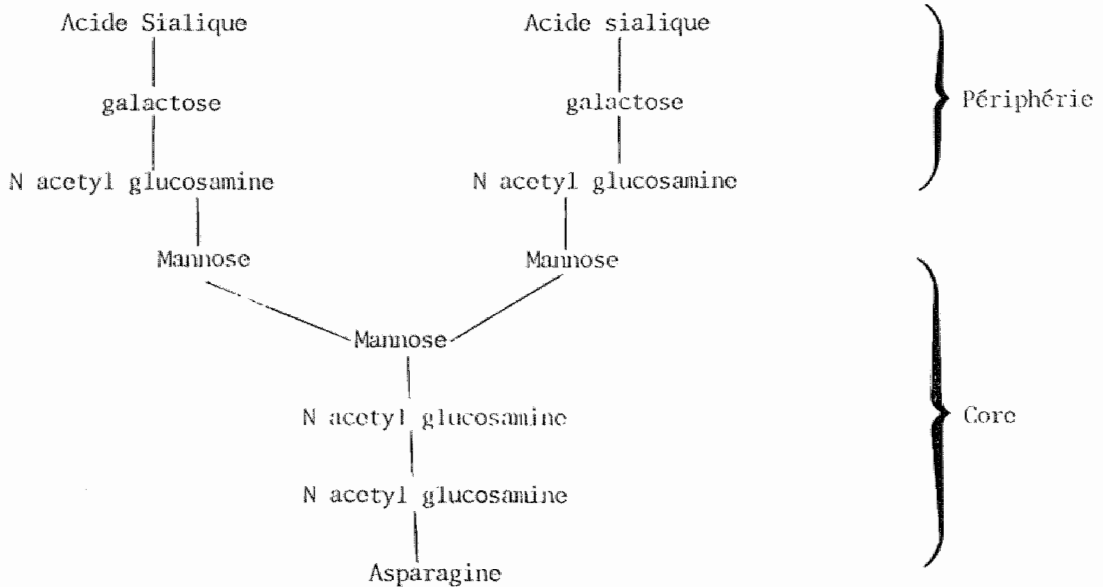


Figure 4 : Structure de la fraction carbohydrates du fibrinogène humain.

La première dégradation entraîne l'élimination des appendices qui sortent de chaque nodule latéral et conduit à la formation du fragment X. Le fragment X est alors dégradé de façon asymétrique au niveau d'une des deux structures hélicoïdales pour donner naissance au fragment Y et à un fragment D. Le fragment Y étant composé d'un nodule latéral et du nodule central. Le fragment Y est alors à son tour dégradé au niveau de l'hélice réunissant les deux nodules, libérant un nouveau fragment D et le fragment E. Les différences de structure entre les deux domaines latéraux et le domaine central a été démontré par des études immunologiques montrant des déterminants antigéniques distincts pour les fragments D (nodules latéraux) d'une part, et pour le fragment E (nodule central) d'autre part.

B. STRUCTURE PRIMAIRE ET SECONDAIRE DU FIBRINOGENE

La molécule de fibrinogène est formée de 6 chaînes polypeptidiques (13, 87) symétriques deux à deux : Deux chaînes A alpha, deux chaînes B beta et deux chaînes gamma dont la séquence en aminoacides est actuellement établie (93). Seules les chaînes B beta et A alpha renferment des carbohydrates formés d'acide sialique, de galactose, de N acetyl glucosamine et de mannose. Les carbohydrates sont attachés aux chaînes polypeptidiques au niveau de l'asparagine par une liaison N glycosidique. Leur structure est biantennaire et est représenté dans la figure 4.

Les 6 chaînes sont réunies entre elles par 29 ponts disulfures (88). La molécule ne contient pas de résidu cystéine libre.

De la séquence en acides aminés, il ressort que les résidus cystéine sont concentrés dans 3 zones le long de chaque chaîne, l'une à l'extrémité N terminal, la deuxième dans une zone intermédiaire et la troisième à l'extrémité C terminal. L'emplacement des ponts S-S a été déterminé sur le fibrinogène dégradé au niveau de la méthionine par le bromure de cyanogène (12, 93).

1) Produits de dégradation du fibrinogène par le bromure de cyanogène :

Cette dégradation conduit à l'apparition de 5 fragments de dégradation appelés de FCB1 à FCB5 (FCB = Fibrinogène Cyan-Bromide) (Fig. 4). Le plus gros fragment est appelé FCB1 (anciennement N-DSK ou N terminal disulphide Knot) (49). Il a structure dimérique (18) et renferme les extrémités N terminal des 6 chaînes. Il contient 11 ponts S-S et trois d'entre eux connectent les deux moitiés de la molécule de fibrinogène. Une liaison S-S est située entre les deux chaînes alpha, deux liaisons S-S entre les deux chaînes gamma. Le FCB1 a une structure voisine du fragment E de dégradation du fibrinogène. Le deuxième fragment ou FCB2 (72, 90) (encore appelé H01-DSK car hydrophobe) est un peu plus petit que le FCB1, il a une structure monomérique, ce qui explique qu'il y a deux fragments FCB2 par molécule de fibrinogène. Il contient des fractions intermédiaires des trois chaînes d'une moitié de la molécule de fibrinogène. Il renferme 6 ponts S-S.

Les fragments FCB3 (ou Hi2 DSK), FCB4 (ou Ho2 DSK) et FCB5 ont des structures monomériques correspondant respectivement aux extrémités C terminal des chaînes A alpha, B beta et gamma. Ils renferment chacun un pont S-S (72, 91). La figure 5 représente la

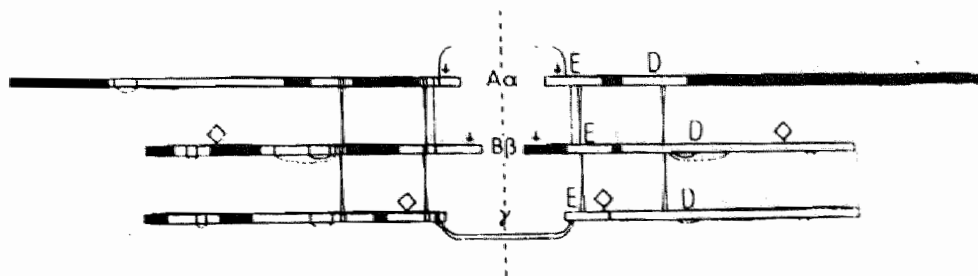


Fig. 5 : Structure primaire du fibrinogène

(les lignes de connection représentent les ponts disulfure)

Sur le côté gauche de la molécule, les parties blanches représentent les différents produits de dégradation par le Bromure de cyanogène.

Sur le côté droit de la molécule, les parties blanches représentent les fragments de dégradation par la plasmine.

(d'après Henschen et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983, 408, 27).

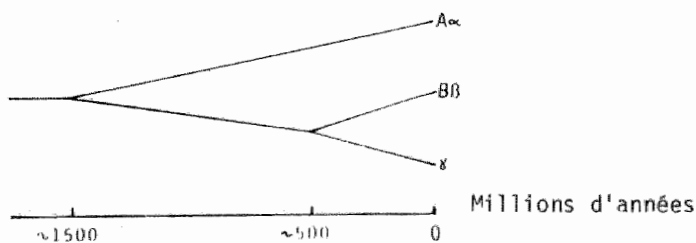


Fig. 6 : Evolution des 3 chaînes du fibrinogène au cours du temps.

(d'après Henschen et al.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983, 408, 27).

relation existant entre fragments de dégradation par la plasmine et ceux induits par le bromure de cyanogène.

L'étude des sites de dégradation par la plasmine des chaînes d'une part, et celle des sites intervenant dans les différentes étapes de la fibrinoformation sur chaque chaîne d'autre part, sont étudiés au niveau des paragraphes correspondants.

2) Chaînes du fibrinogène

a) La chaîne A alpha :

Elle a point moléculaire de 66.000 daltons et renferme 610 acides aminés. Les 16 premiers acides aminés de cette chaîne constituent le fibrinopeptide A (FpA) qui est libéré après action de la thrombine sur le fibrinogène (9, 118). La microhétérogénéité du FpA a été décrite au paragraphe concernant la biosynthèse du fibrinogène. De plus, alors que la séquence en acides aminés de 1 à 7 est variable selon les espèces, la séquence de la position 8 à 16 est conservée au cours de l'évolution des espèces (66) et une mutation dans cette dernière séquence entraîne un allongement important du temps de coagulation par la thrombine. Le rôle essentiel de cette fraction peptidique dans la liaison du fibrinogène avec la thrombine a été évoquée par Blomback qui a suggéré que la phénylananine en position 8 est spatialement proche de la liaison glycine-arginine rompue par la thrombine et en se liant à la thrombine participe de ce fait à l'interaction de cette zone avec la thrombine (16, 17).

Le tripeptide gly-pro-arg qui fait suite au FpA sur la chaîne A alpha peut être libéré après action prolongée de la thrombine sur certains fragments, tel le FCB1 (21). Ce tripeptide qui est également

très conservé au cours de l'évolution joue un rôle dans la polymérisation. En effet, Laudano et Doolittle (113, 114) ont montré que ce tripeptide avait la propriété de se combiner au fibrinogène et au fragment D. De plus, lorsqu'il se combine au fibrinogène il inhibe la coagulation de ce dernier par la thrombine. Ce tripeptide constitue le site de polymérisation "A". Le fait que ce peptide se lie au fragment D1 et non au fragment D3 (dont la chaîne gamma est plus dégradée que celle du fragment D1, au niveau de l'extrémité C terminal comme il sera vu au chapitre concernant la dégradation du fibrinogène) permet de conclure que le site complémentaire "a" qui se lie au gly-pro-arg est situé à l'extrémité C terminal de la chaîne gamma (46).

b) La chaîne B beta

Elle a un poids moléculaire de 52.000 daltons et est constituée de 461 acides aminés. Elle renferme une chaîne biantennaire d'hydrates de carbone fixées sur l'asparagine en position 364 (92, 183). Les 14 premiers acides aminés de la chaîne constituent le fibrinopeptide B (FpB) qui est détaché par action de la thrombine (15). Comme pour la chaîne A alpha, le tripeptide gly-his-arg qui fait suite au FpB joue un rôle dans la polymérisation de la fibrine. Ce tripeptide constitue le site "B" de polymérisation qui se lie à un site complémentaire "b" situé dans le domaine D de la molécule (46).

c) La chaîne gamma

Elle a un poids moléculaire de 48.000 daltons et est constituée de 411 acides aminés. Comme la chaîne beta, elle renferme une chaîne bicatenaire d'hydrates de carbone fixés sur l'asparagine en position 52 (106).

De nombreuses homologies existent entre les trois chaînes, ce qui a fait suggérer à Henschen l'existence d'un ancêtre commun à ces trois chaînes (96) (Fig. 6). Ces chaînes sont associées entre elles par des forces attractives et également par des liaisons S-S.

3) Sites de fixation du calcium sur la molécule de fibrinogène

Il existe trois sites de fixation du calcium sur le fibrinogène. Deux sont présents sur le domaine D de la molécule, au niveau de l'extrémité C terminal de la chaîne gamma (138), tandis que le troisième site de fixation est situé sur le fragment E (139). La séquence en acides aminés correspondant aux sites de fixation du calcium au niveau des chaînes gamma et des chaînes beta a été proposée par Henschen du fait de l'homologie de la séquence en amino acides de ces zones, avec celles fixant le calcium au niveau de la calmoduline (197).

II. BIOSYNTHÈSE DU FIBRINOGENE

Le fibrinogène est une protéine synthétisée principalement par le foie (175), mais aussi par les méga-caryocytes (8). Sa production hépatique est assez importante, puis 1,5 à 5 g de fibrinogène sont synthétisés par jour.

La demi vie du fibrinogène est de 3 à 5 jours.

Chaque chaîne apparaît être le produit de gènes distincts et les chaînes formées s'assemblent au niveau du réticulum

endoplasmique. La synthèse du fibrinogène peut augmenter sous l'influence de différents stimuli et constitue une protéine importante de l'inflammation.

Des expériences effectuées après incorporation de séléno-méthionine, il ressort que contrairement à ce qui est observé pour de nombreuses protéines, des variations importantes de la concentration plasmatique en fibrinogène ne jouent aucun rôle dans la régulation de la synthèse de cette protéine (3). En revanche le fragment D injecté à l'animal induit une synthèse accrue de fibrinogène par l'hépatocyte (105). Il reste toutefois à établir si le fragment D, normalement présent en petite quantité dans le sang circulant, joue un rôle physiologique important dans la biosynthèse du fibrinogène. De plus, il se pourrait que le fragment D ne constitue qu'un intermédiaire dans cette stimulation.

Le fibrinogène ainsi synthétisé présente une microhétérogénéité.

L'hétérogénéité au niveau de la chaîne A alpha a une double origine.

- La première est liée à la composition du fibrinopeptide (FpA) situé à l'extrémité N terminal de la chaîne A alpha (15, 104). L'acide aminé N terminal du FpA peut manquer (FpAy) ou le résidu sérine en position 2 peut être phosphorylé (FpAP).

- La deuxième est liée au fait que la chaîne A alpha est très susceptible à une dégradation protéolytique, le fragment de chaîne A alpha qui sort du domaine D étant très vulnérable.

Toutefois l'attaque protéolytique de la chaîne A alpha qui a lieu in vivo n'est pas très bien établie. En effet, une dégradation du fibrinogène par la plasmine ne semble pas pouvoir s'effectuer car

la génération de plasmine à partir du plasminogène, ne se produit qu'en présence d'un caillot de fibrine (101). De plus, la plasmine susceptible d'être générée est neutralisée par les antiplasmines circulantes (33, 37). Il semblerait plutôt que la dégradation du fibrinogène se fasse par l'intermédiaire d'autres enzymes protéolytiques, tels certains enzymes leucocytaires (156).

L'hétérogénéité de la chaîne B beta semble être uniquement liée à une teneur en acide sialique variable. Cette microhétérogénéité peut être mise en évidence par chromatographie échange d'ions ou par isofocalisation. La chaîne B beta L contiendrait deux molécules d'acide sialique, tandis que la chaîne B beta R n'en contiendrait qu'une (73).

L'hétérogénéité de la chaîne gamma a également une double origine.

Comme pour la chaîne B beta, la chaîne gamma peut posséder un ou deux résidus d'acide sialique (176).

Outre cette glycosylation différente, il existe aussi deux types de chaînes gamma, l'hétérogénéité résidant au niveau de la partie C terminal de cette chaîne. Cette hétérogénéité a été démontré par chromatographie du fibrinogène sur DEAE cellulose avec élution en gradient. En effet, deux pics majeurs de fibrinogène pouvaient être identifiés (53). Le premier pic constitue 85 % de la totalité du fibrinogène et est caractérisé par la structure (A alpha, B beta, gamma)₂. Le deuxième pic ne renferme que 15 % du fibrinogène dont la moitié des chaînes gamma est identique à celle du premier pic, tandis que l'autre moitié des chaînes gamma est constitué par des chaînes

gamma' dont le poids moléculaire est supérieur de 2.000 daltons par rapport à celui des chaînes gamma (61, 133). La séquence supplémentaire de la chaîne gamma' est de 20 acides aminés commençant à 4 résidus de l'extrémité C terminal de la chaîne gamma (192). Cette séquence peptidique supplémentaire est particulièrement riche en acide glutamique et en acide aspartique, expliquant la charge négative élevée de la chaîne gamma' et l'élution retardée de ce deuxième pic par rapport au premier.

Il a été montré que les hépatocytes peuvent synthétiser du fibrinogène contenant les deux types de chaînes et que dans ce deuxième pic la structure du fibrinogène est représentée par la formule (A alpha)₂, (B beta)₂, (Gamma, Gamma') (135). Un troisième pic de fibrinogène présent à l'état de traces est constitué uniquement de la forme (A alpha, B beta, gamma')₂.

L'analyse d'un fibrinogène anormal hétérozygote (fibrinogène Paris I) a permis de montrer que ces chaînes gamma et gamma' dériveraient vraisemblablement d'un seul gène. En effet, dans le variant gamma Paris I, il est retrouvé des chaînes gamma Paris I et des chaînes gamma' Paris I (191). Si les chaînes gamma et gamma' étaient codées par deux gènes différents la mutation de Paris I ne se produirait que pour un seul gène et seule la chaîne gamma Paris I serait anormale et non les deux chaînes gamma et gamma'. Il semblerait donc que les deux chaînes gamma et gamma' soient codées par un même gène mais qu'il y aurait deux épissages différents sur le mRNA conduisant à la synthèse de chaînes gamma et gamma' (192).

Concernant la biosynthèse du fibrinogène au niveau des

mégacaryocytes, les études sont contradictoires. Toutefois, Belloc et al. (8) ont montré une biosynthèse du fibrinogène par les mégacaryocytes. Concernant l'étude génétique, le fibrinogène intraplaquettaire dans les dysfibrinogénémies congénitales a été trouvé anormal dans certains cas, normal dans d'autres. Mais un trouble de stockage de la forme anormale n'est pas exclu. De même, il a été trouvé que le fibrinogène plaquettaire ne renfermait pas de chaîne gamma' (60), mais là encore il se pourrait que du fait de la présence de nombreux résidus acides présents dans cette chaîne gamma', seul le fibrinogène (A alpha)₂, (B beta)₂ et (gamma)₂ pouvait être stocké, tandis la forme (A alpha)₂, (B beta)₂, (gamma, gamma') moins hydrophobe que la forme précédente ne puisse pas être internalisée dans les granules alpha.

III. CATABOLISME DU FIBRINOGENE

Le catabolisme du fibrinogène est inconnu. En effet, comme il a déjà été souligné la dégradation du fibrinogène par la plasmine n'est pas physiologique. La mise en évidence de chaînes A alpha dégradées pourrait être liée à une dégradation lors de la purification du fibrinogène.

La présence de fpA dans le sang circulant témoigne d'un processus de coagulation in vivo, mais les calculs tenant compte de la quantité de fpA d'une part, et de la demi-vie du fpA dans la circulation d'autre part, semblent démontrer que seulement 2 à 3 % du fibrinogène serait ainsi catabolisé.

IV. LA FIBRINOFORMATION

La transformation du fibrinogène en fibrine s'effectue schématiquement en 3 étapes principales :

- action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène aboutissant après élimination des fibrinopeptides A puis B au monomère de fibrine.

- agrégation des monomères de fibrine par des forces attractives.

- stabilisation de la fibrine par action du facteur XIIIa.

En réalité les différents stades sont étroitement intriqués.

L'initiation de la fibrinoformation réside dans le clivage protéolytique par la thrombine de la chaîne A alpha du fibrinogène au niveau de la liaison gly-arg située en position 16-17 conduisant à la libération de deux fibrinopeptides A à partir des deux chaînes A alpha et à la formation du monomère (des A) de fibrine (59). Cette élimination du fibrinopeptide A va permettre l'agrégation des monomères de fibrine par des forces attractives (52, 131). En effet, l'élimination des fibrinopeptides A va entraîner le démasquage de sites de polymérisation permettant ainsi l'agrégation des monomères.

Le schéma de l'agrégation des monomères est partiellement établi : après élimination des fibrinopeptides A, deux monomères vont s'unir, le domaine E d'un monomère, s'unissant au domaine D d'un autre monomère créant ainsi un dimère dont les deux sous unités se chauvauchent.

Puis par un mécanisme identique d'union du domaine D d'un monomère avec le domaine E d'un autre monomère, des monomères vont s'accrocher à chaque extrémité de ce dimère formant ainsi des protofibrilles à deux brins où les molécules de monomères se chevauchent, comme le montre la Figure 7.

Secondairement à cette polymérisation longitudinale, les protofibrilles vont s'associer latéralement pour donner naissance à des fibres plus épaisses. Cette polymérisation latérale est secondaire à la protéolyse de la chaîne B beta par la thrombine au niveau d'une liaison gly-arg située en position 14-15, l'élimination du fibrinopeptide B à partir de la chaîne B beta favorisant la polymérisation latérale des protofibrilles.

Le mécanisme biochimique de cette polymérisation est actuellement partiellement connu. La polymérisation résulte de deux types d'interactions (27) :

- l'interaction du site "A" avec un site complémentaire "a" situé dans le domaine D et présent au niveau de l'extrémité C terminal de la chaîne gamma. Le site "A" situé à l'extrémité N terminal de la chaîne alpha est non disponible dans le fibrinogène, mais exposé après élimination du fpA.

- l'interaction du site "B" avec un site complémentaire "b", situé dans le domaine D et présent au niveau de l'extrémité C terminal de la chaîne beta. Le site "B" situé à l'extrémité N terminal de la chaîne beta est non disponible dans le fibrinogène mais exposé après élimination du fpB.

Conjointement à cette polymérisation transversale, le caillot

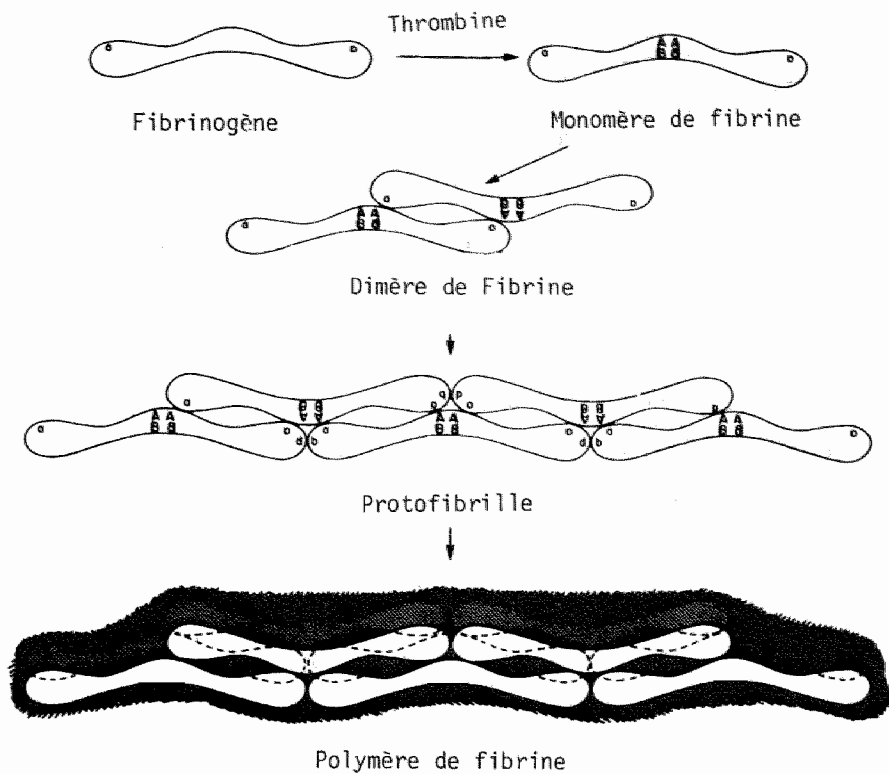


Fig. 7 : Schéma de la polymérisation des monomères de fibrine.
(d'après Budzynski et al.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983, 408, 299).

de fibrine va être stabilisé par le facteur XIIIa en présence de calcium. L'activation du facteur XIII en facteur XIIIa nécessite l'action de la thrombine : La stabilisation est due à la formation de liaisons de transamidation entre la glutamine, qui joue le rôle d'accepteur, et la lysine, qui joue le rôle de donneur (119). Cette stabilisation de la fibrine se fait elle même en deux étapes. La première, très rapide qui nécessite peu de facteur XIII, entraîne la formation de liaisons entre deux chaînes gamma de deux monomères différents de fibrine, créant la formation de liaisons très stables entre deux domaines D de deux molécules adjacentes de monomères. Les chaînes gamma de deux monomères de fibrine étant orientées de façon antiparallèle, il y a création entre les deux chaînes gamma, de deux liaisons (glutamyl)-lysine entre les sites donneurs (lys 405) et accepteur (Gln 307) comme le montre la figure 8 (32, 165).

La deuxième étape, plus lente et nécessitant plus de facteur XIIIa que pour l'étape précédente, consiste en la formation de liaisons de covalence entre plusieurs chaînes alpha de différents monomères de fibrine. Chaque chaîne alpha possède deux sites glutamyl accepteurs (position 328 et 366) et cinq sites lysine donneurs potentiels (entre alpha 518 et alpha 584) entraînant ainsi la formation d'un réseau hautement intriqué en liaison de covalence (40). Cette formation de liaisons de covalence entre les chaînes alpha de fibrine stabilise le caillot et peut être aussi favorise l'association latérale des protofibrilles qui forment alors des fibres épaisses et opaques. Le caillot ainsi stabilisé est moins facilement dégradé par la plasmine qu'un caillot non stabilisé, car les zones hélicoïdales qui constituent des zones stratégiques dans l'attaque protéolytique sont alors protégées (67, 98).

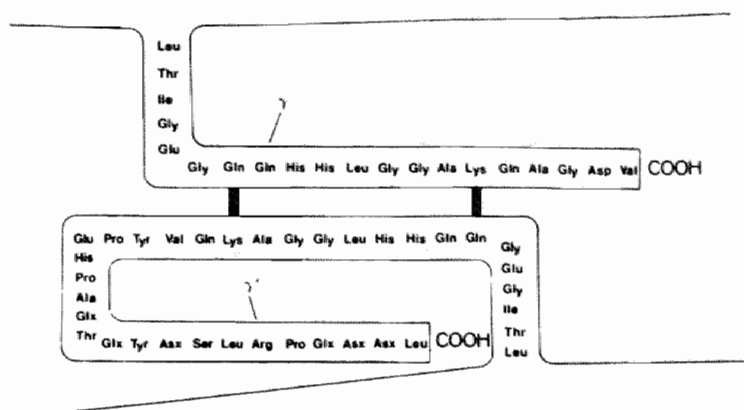
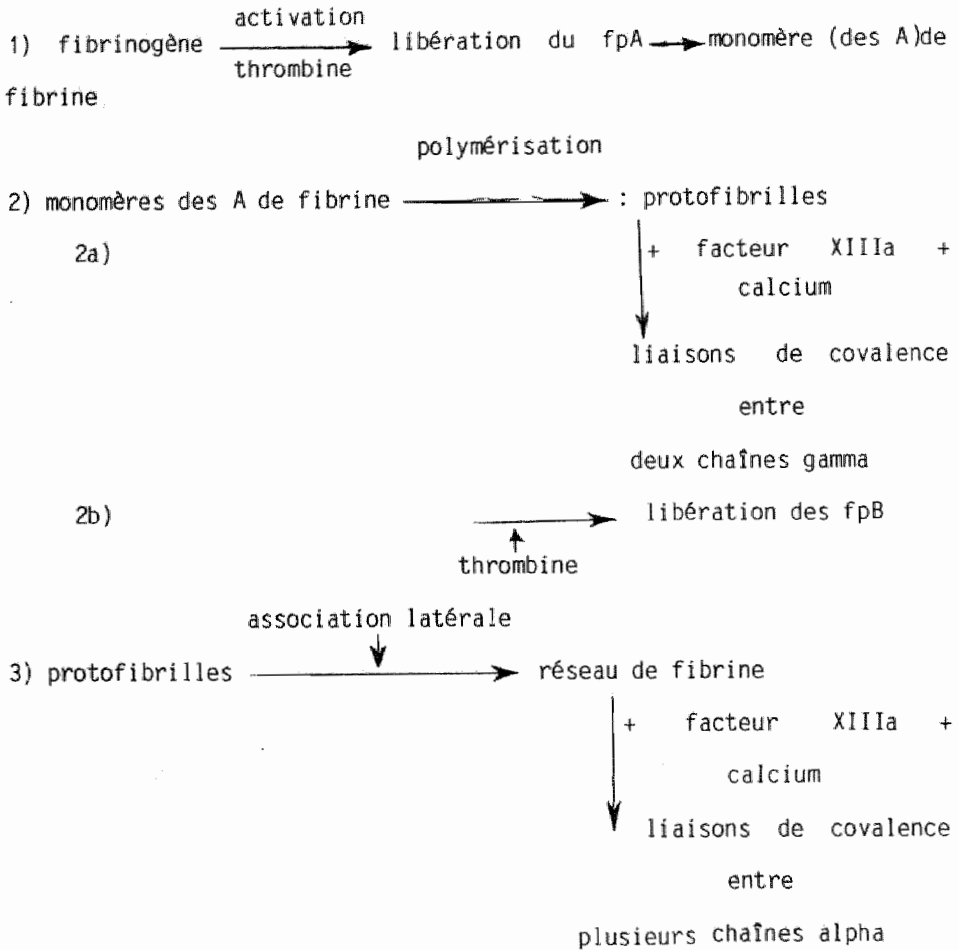


Fig. 8 : Schéma de la dimérisation des chaînes gamma induite par le facteur XIIIa.
(d'après Mo
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983, 408, 97).

Tableau I. Schéma de la fibrinoformation selon Hantgan et al. (82).



In vivo la formation de fibrine s'effectuerait en deux étapes (19). La fibrine I est la fibrine formée initialement lors de la libération du seul fibrinopeptide A. La fibrine II a une structure plus compacte et est formée après le départ du fibrinopeptide B.

Il était admis que la libération du fibrinopeptide B ne se

produisait qu'après la polymérisation liée au départ du fibrinopeptide A, la polymérisation rendant plus accessible la liaison gly-arg rompue par la thrombine sur la chaîne B beta. Cependant, récemment, par l'analyse de la fibrinoformation, dans le cas d'un fibrinogène anormal (fibrinogène Metz) il a pu être montré que la coagulation pouvait être liée uniquement à une polymérisation secondaire au départ des fibrinopeptides B, les fibrinopeptides A n'étant pas détachés de la chaîne A alpha de ce fibrinogène. En effet, dans ce fibrinogène l'arginine en position 16 de la chaîne A alpha, est mutée par de la cystéine et la liaison cys-gly n'est pas attaquée par la thrombine (95).

Dans les coagulations intra-vasculaires (CIVD) outre les dépôts de fibrine, les monomères de fibrine s'associent aussi avec du fibrinogène ou avec des produits de dégradation issus de la fibrine (ou du fibrinogène) formant des complexes solubles (103, 162, 164). La recherche de ces complexes solubles de haut poids moléculaire dans le sang constitue un critère important de diagnostic des CIVD.

D'autres enzymes que la thrombine peuvent entraîner la coagulation du fibrinogène, c'est par exemple le cas de la reptilase qui ne détache que le fpA et non le fpB.

V. RAPPEL SUR LA DEGRADATION DU FIBRINOGENE ET DE LA FIBRINE PAR LA PLASME

La plasme est une enzyme protéolytique qui clive les liaisons lysine-arginine du fibrinogène et de la fibrine. Elle résulte de la transformation du plasminogène inactif en plasme, enzyme active. Cette activation a lieu sous l'influence de différents activateurs :

- l'activateur tissulaire du plasminogène (tpA) sécrété par la cellule endothéliale (74). Toutefois l'activation du plasminogène par le tpA n'a lieu qu'en présence de fibrine. Hoylaerts (100) a suggéré l'existence d'un complexe ternaire fibrine tpA-plasminogène.

- l'urokinase (186) (UK) qui existerait dans le plasma sous forme de pré-urokinase inactive. Cette pré-UK serait transformée en UK active sous l'influence de traces de plasme.

- le facteur XII activé de la coagulation combiné à un co-facteur encore inconnu (79, 136).

Du fait de la présence de grande quantités d'antiplasmes circulantes qui neutralise la plasme circulante et du fait de la potentialisation induite par la fibrine lors de l'activation du plasminogène en plasme, la dégradation du fibrinogène circulant ne semble pas avoir lieu in vivo. En revanche, la fibrine qui ne renferme que peu d'antiplasmes peut être aisément dégradée par la plasme.

Nous étudierons séparément le schéma de dégradation du fibrinogène et de la fibrine par la plasme.

A. DEGRADATION DU FIBRINOGENE

La dégradation du fibrinogène par la plasmine est représentée dans la figure 9 (179).

- Le premier stade de la dégradation aboutissant aux fragments X. Le stade le plus précoce de la dégradation du fibrinogène est la rupture de la chaîne A alpha au voisinage de l'extrémité C terminal (134). Un peptide de 27 acides aminés est tout d'abord libéré à partir de l'extrémité C terminal de la chaîne A alpha (39) et cette forme un peu dégradée du fibrinogène serait pour certains auteurs présente en quantité non négligeable dans le sang circulant (94). Puis, cette chaîne A alpha est de nouveau dégradée en différents endroits localisés entre de deuxième tiers de la chaîne (au niveau de l'extrémité C terminal) et le premier tiers au niveau de l'extrémité N terminal). Cette dégradation entraîne une augmentation de la solubilité et une diminution de la coagulabilité de la protéine (97).

Parallèlement la chaîne B beta est également attaquée par la plasmine au voisinage de l'extrémité N terminal libérant une série de peptides parmi lesquels le B beta 1-42, le B beta 1-21 et le B beta 13-53. Certains d'entre eux, tel que le B beta 1-42 constituent des marqueurs de l'attaque protéolytique du fibrinogène (160).

L'ensemble de ces dégradations conduit à la production de la famille de fragments X (précoces ou tardifs) selon l'importance de la dégradation.

- Le deuxième stade de la dégradation (120, 122) est constitué par clivage assymétrique du fragment X dans une zone localisée au

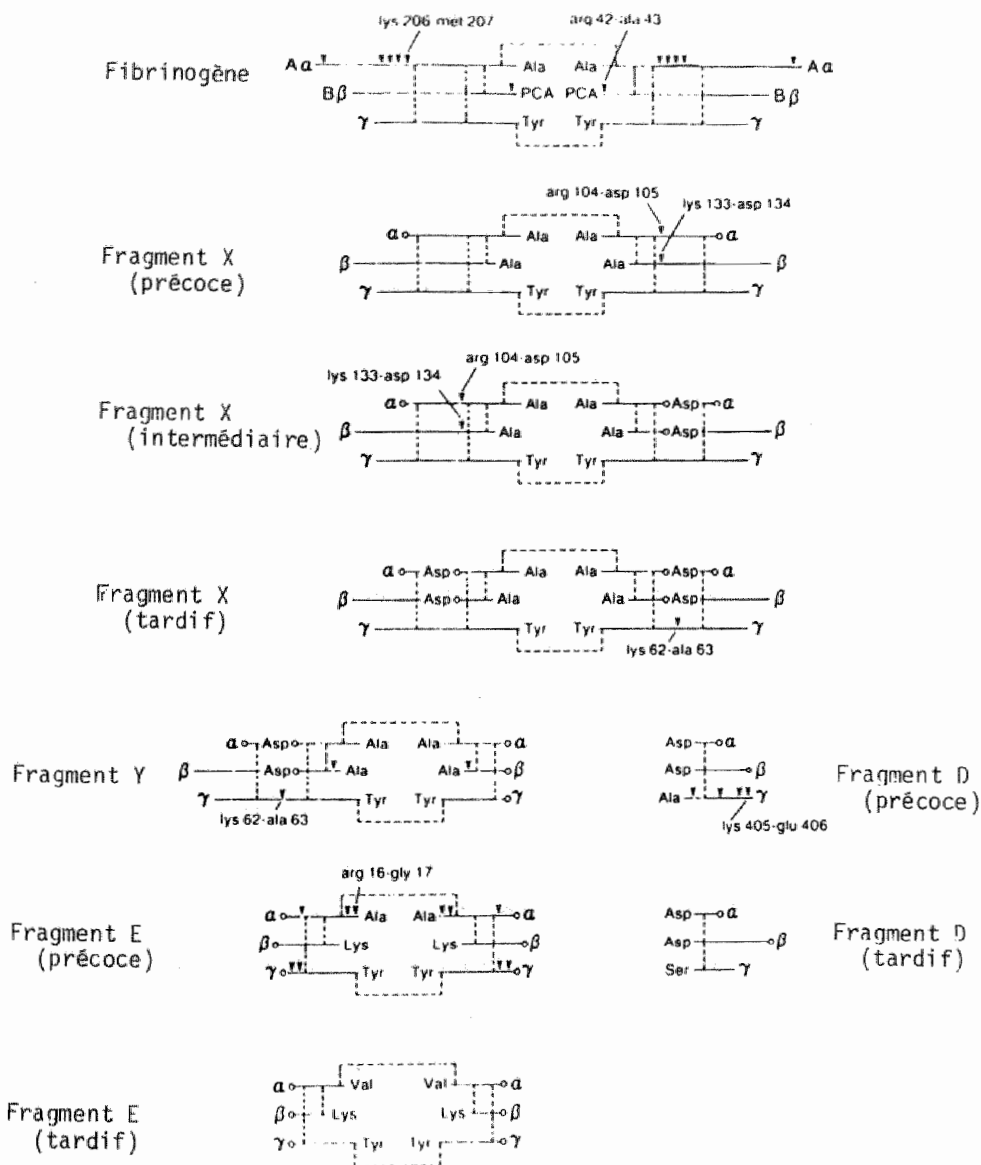


Fig. 9 : Dégradation du fibrinogène par la plasmine.

Emplacement des différents sites de dégradation enzymatique
(d'après Takagi et Doolittle, Biochemistry, 1970, 14, 940)

milieu de la structure hélicoïdale, intéressant les trois types de chaînes d'un seul côté de la molécule et libérant une molécule de fragment D à partir d'un des domaines C terminaux, tandis que le fragment résiduel, assez important, constitue le fragment Y. Le fragment D est donc constitué du domaine D et d'une partie de la structure hélicoïdale. Le fragment Y étant constitué de la deuxième partie de la structure hélicoïdale, coupée par la plasmine, et des domaines D et E réunis par la deuxième structure hélicoïdale non attaquée (120, 122, 123). Ce schéma est représenté dans la figure 10.

- Le troisième stade de la dégradation consiste en la dégradation du fragment Y conduisant à la formation d'un autre fragment D et du fragment E, de poids moléculaire respectifs de 100.000 et de 50.000. Ce clivage a lieu au niveau de la deuxième structure hélicoïdale qui n'avait pas encore été scindée lors du clivage asymétrique du fragment X (62, 63, 124). Une série de clivages au niveau de la chaîne gamma donne naissance à des fragments D plus dégradés : le premier de ces clivages a lieu au voisinage de l'extrémité N terminal, mais secondairement la chaîne gamma résiduelle est également dégradée à partir de l'extrémité C terminal (97).

Il est à noter que le calcium influence aussi la structure du fragment D de dégradation (84), le calcium protégeant la chaîne gamma d'une dégradation plasminique plus poussée. En présence de calcium la chaîne gamma du fragment D possède un poids moléculaire de 38.000 et le résidu C terminal est l'acide aminé en position gamma 411 du fibrinogène. En revanche, en présence d'EGTA la chaîne gamma du fragment D a un poids moléculaire de 25.000 et le résidu C terminal

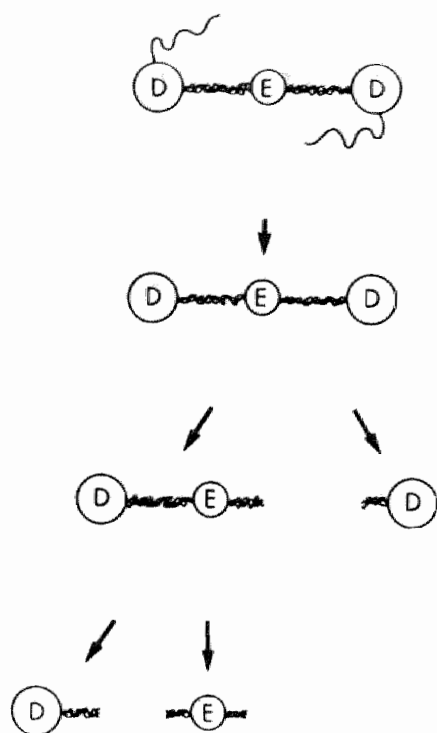


Fig. 10 : Dégradation asymétrique de la
molécule de fibrinogène.
(d'après Marder et al.
J. Biol. Chem. 1969, 244, 2111).

est l'acide aminé en position gamma 303. La transition entre le fragment D1 (obtenu lors de la dégradation du fibrinogène en présence du calcium) et le fragment D3 (obtenu après clivage du fibrinogène en présence d'EGTA) résulte donc d'un clivage de la chaîne gamma au niveau du résidu gamma 303.

Ces dégradations plus ou moins poussées sur la chaîne gamma sont très importantes à considérer car la chaîne gamma du fragment D1 ou D cate possède un site de polymérisation, tandis que celle du fragment D3 ou DEGTA en est dépourvue. Ainsi l'étude d'un tel fragment gamma 303-gamma 411 peut apporter des éléments concernant la nature de ce site de polymérisation.

De même Marguerie et PLOW d'une part (125) et Niewiarowski et al. d'autre part (137) ont montré que le fragment D1 contrairement au fragment D3 possédait un site permettant au fibrinogène de se lier aux plaquettes stimulées par l'ADP. Hawiger (86) isolant différents peptides de la chaîne gamma, a pu montrer que le peptide intervenant dans la fixation du fibrinogène sur les plaquettes stimulées était le penta decapeptide gamma 397-gamma 411.

De même que pour le fragment D, le fragment E peut subir aussi différents clivages par la plasmine, conduisant à un produit final, le fragment E tardif, de poids moléculaire 35.000. Ces clivages tardifs du fragment E ayant lieu au niveau de l'extrémité N terminal de la chaîne A alpha entraînent une disparition du site de polymérisation "A" complémentaire du site "a" présent au niveau du fragment D (150).

B. DEGRADATION DE LA FIBRINE STABILISEE

La dégradation de la fibrine stabilisée conduit à la formation de différents produits de dégradation dont l'architecture est dérivée de celle de la fibrine, tenant compte des liaisons réunissant les monomères de fibrine en protofibrilles à deux brins (57). De plus les sites de dégradation du fibrinogène par la plasmine sont également accessibles sur la fibrine stabilisée (65, 124).

On appelle fragment, des dérivés réunis entre eux par des liaisons de covalence, donc non dissociables par les détergents, il s'agit par exemple du fragment DD réunis par les liaisons de covalence au niveau des chaînes gamma tandis que les complexes consistent en l'association de un ou plusieurs fragments réunis entre eux par des forces attractives et donc dissociables par les détergents (57).

La première sous-unité décrite a été le complexe D-D-E résultant de l'association par des forces attractives d'un fragment D-D issu de deux monomères adjacents, avec un fragment E provenant d'un troisième monomère présent sur l'autre brin de la protofibrille (64, 101), comme l'illustre la figure 11.

Plus tard, d'autres complexes de plus haut poids moléculaire ont été mis en évidence (1). Leur structure a pu être établie par différents auteurs en confrontant les résultats fournis par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non dissociant de ces complexes, d'une part, et ceux fournis en milieu dissociant d'autre part (56, 69, 70, 80). C'est ainsi que Francis et Marder ont classé les dérivés de dégradation plasminique de la fibrine stabilisée

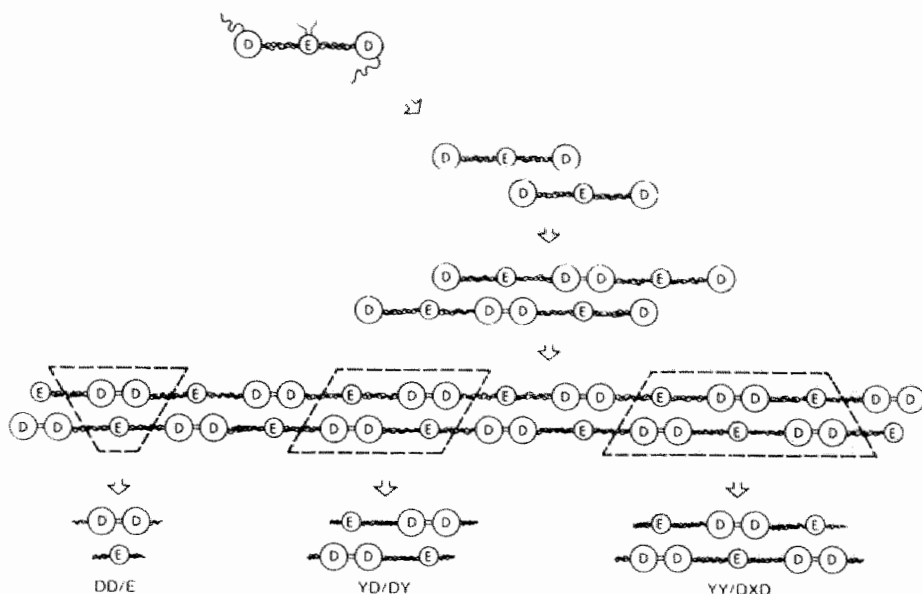


Fig. 11 : Schéma de la dégradation de la fibrine stabilisée. Formation de divers complexes.

(d'après Marder et al. Haemost. and Thromb. 1982, p 145, Lipincott Company).

Complexes	PM	Structure	Fragments	PM	Structure
DD/E	228,000		E*	44-55,000	
			D*	100,000	
DY/YD	465,000		Y*	150,000	
			DD	195,000	
YY/DXD	703,000		X*	247,000	
			DY	247,000	
YXD/DXY	850,000		YY	285,000	
			XD	334,000 or 365,000	
			XY	365,000 or 391,000	
			DXD	461,000	
			YXD	500,000	

Fig. 12 : Principaux complexes de dégradation de la fibrine stabilisée.

(d'après Marder et Francis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1983, 408, 395).

PM : Poids Moléculaire.

en différents complexes issus de l'association de différents fragments (58). Ceci est objectivé dans les figures 12 et 13.

Lors d'une très longue exposition des complexes D-D-E à la plasmine, il peut y avoir dissociation du complexe en fragments D-D et en fragment E (148), car le fragment E est dégradé en fragment E tardif perdant alors le site de polymérisation "A". Toutefois, ce phénomène n'est jamais observé *in vivo*, mais seulement *in vitro*.

La dégradation de la fibrine stabilisée par la plasmine se fait en différentes phases (58, 57, 125), la dégradation commençant par la périphérie du caillot (Figure 14).

- 1ère Phase : il y a une protéolyse très limitée du caillot à sa surface, les produits de dégradation restant fixés à la surface du caillot car les domaines D et E restent fixés de façon covalente à la matrice de la fibrine.

- 2ème Phase : les produits de dégradation de la fibrine restent fixés à la matrice du caillot par les forces attractives et de ce fait peuvent être détachés du caillot par des détergents, tel le SDS.

- 3ème Phase : les complexes solubles de dégradation sont libérés spontanément du caillot.

- 4ème Phase : les complexes de dégradation libérés sont alors dégradés en complexes de plus petite taille et dont le plus petit est le complexe D-D-E.

En fait, si les complexes D-D-E sont bien formés *in vitro*, *in vivo* les complexes de haut poids moléculaire sont protégés d'une dégradation plasminique par les antiplasmines circulantes. Ce qui

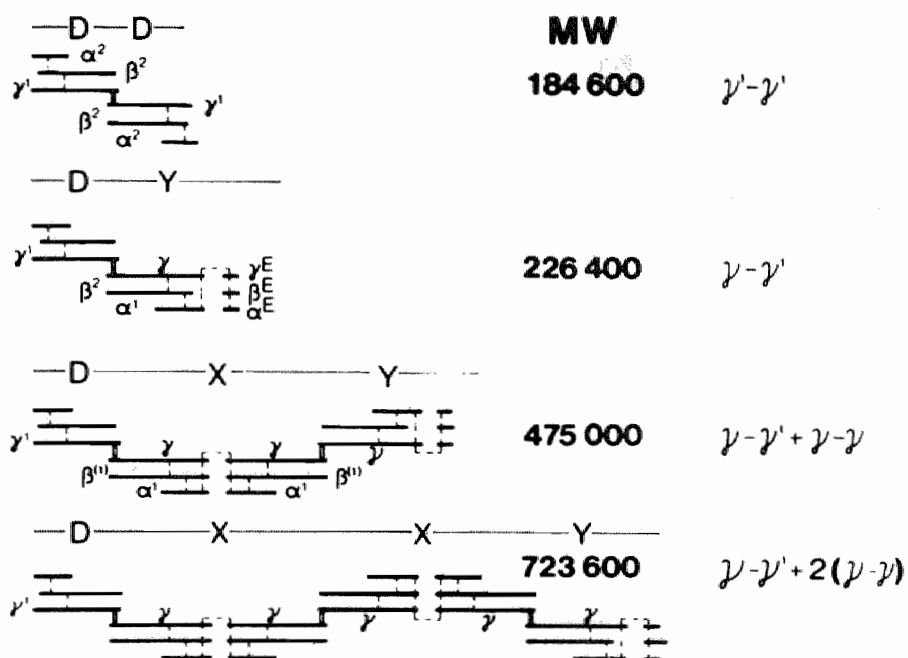


Fig. 13 : Structure des complexes de
dégradation de la fibrine stabilisée.

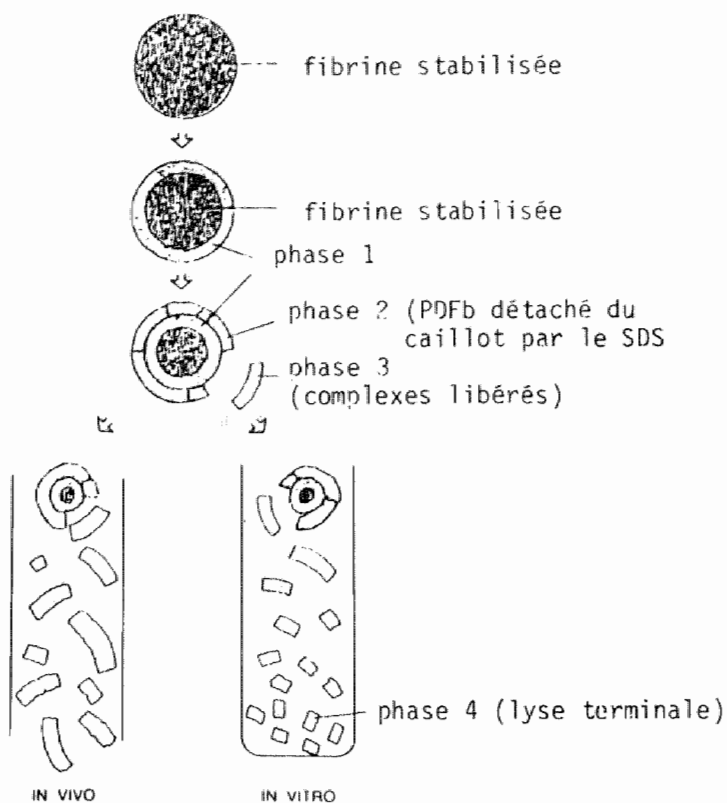


Fig. 14 : Différentes étapes de la dégradation de la fibrine.

(d'après Francis, Marder, Barlow
J. Clin. Invest. 1980, 66, 1033).

explique que les complexes D-D-E sont en quantité peu importante et que l'on trouve principalement des complexes de haut poids moléculaire.

VI. ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DE LA MOLECULE DE FIBRINOGENE

L'analyse immunochimique du fibrinogène a beaucoup progressé ces dernières années. En effet, de nombreux anticorps capables de reconnaître différents épitopes de la molécule ont été produits. Ces études permettent de tirer des conclusions sur la configuration de la molécule de fibrinogène. En outre, la production de tels anticorps peut permettre d'établir des données sur les relations entre structure et fonction de la molécule. Enfin, dans certains cas, l'utilisation de tels anticorps permettra de reconnaître si la molécule de fibrinogène a été dégradée ou modifiée. Cette dernière application d'anticorps spécifiques peut avoir des champs d'application très vastes dans l'investigation biologique ou l'analyse de certains biomatériaux comme nous l'avons montré. La plupart des anticorps produits et décrits dans la littérature, correspondent à des anticorps obtenus par immunisation de l'animal avec des fragments de la molécule de fibrinogène. A l'heure actuelle des anticorps monoclonaux spécifiques pour certains épitopes sont également produits. Nous allons analyser successivement :

- 1) Les différents épitopes détectables sur la molécule de fibrinogène

- 2) Les modèles proposés pour expliquer l'apparition de néo-antigènes qui sont masqués dans la molécule de fibrinogène intacte

et n'apparaissent qu'après clivage.

3) L'application de cette analyse immunochimique du fibrinogène à l'étude de la structure tertiaire de la molécule de fibrinogène et à l'analyse des modifications de cette structure lors de la dégradation du fibrinogène ou lors de la fibrinoformation.

A. LES DIFFERENTS EPITOPES LOCALISES DANS LA MOLECULE DE FIBRINOGENE

1) Epitopes au niveau de la chaîne A alpha du fibrinogène

La chaîne A alpha peut être divisée en trois parties :

- celle qui est présente dans le domaine E (5, 71, 121),
- celle qui est présente dans le domaine D, ce fragment est très court dans la chaîne A alpha (35, 43, 113, 114)
- et les 2/3 de la chaîne A alpha environ (48.000 daltons) situés à l'extérieur des 2 domaines du fait de leur structure hydrophile (83, 99, 180).

a) Epitopes au niveau du fpA :

A l'extrémité N terminal de la chaîne A alpha est localisé le fibrinopeptide A (fpA), qui est libéré du fibrinogène lorsque celui-ci est en contact avec la thrombine ou avec la reptilase. Il est constitué de 16 amino acides (Ala, Asp, Ser, Gly, Glu, Gly, Arg, Phe, Leu, Ala, Glu, Gly, Gly, Gly, Val, Arg).

Deux groupes d'anticorps anti-fpA permettent de différencier deux épitopes pour le fpA.

Le premier groupe d'anticorps réagit avec un épitope qui est faiblement exprimé quand le fpA est intégré dans la molécule de

fibrinogène et qui devient accessible lorsque le fpA est détaché de la molécule de fibrinogène (143). Pour avoir une fixation équivalente d'anticorps, il faut que le fibrinogène soit en concentration molaire 1500 fois plus élevée que celle du fpA libre. Lorsque le fibrinogène est purifié la réactivité pour cet anticorps anti-fpA augmente. Il faut 6 fois moins de fibrinogène isolé que de fibrinogène plasmatique, pour avoir la même fixation d'anticorps sur le fibrinogène. Cette observation indique que lors de son isolement, le fibrinogène a subi une modification structurale permettant une meilleure accessibilité du fpA pour l'anti-fpA. Cet anticorps anti-fpA reconnaît un épitope qui est centré sur les résidu A alpha Phe 8 et Asp 7. Toutefois l'arg en position 16 est également nécessaire à la réactivité de cet épitope (187). Canfield et al. (30) ont suggéré que la conformation du fpA était influencée par son attachement à l'aide d'une liaison covalente au résidu gly-localisé en position 17 dans la chaîne A alpha du fibrinogène. Différents travaux semblent prouver que le défaut de réactivité du fpA dans la molécule de fibrinogène vis-à-vis de ces anticorps n'est pas lié à un encombrement stérique par le reste de la molécule de fibrinogène, mais plutôt à un changement de conformation tertiaire entraînant une modification de l'affinité de l'épitope pour ce type d'anticorps (144).

Le deuxième groupe d'anticorps anti-fpA reconnaît un épitope révélé aussi bien sur le fibrinogène non dégradé que sur le fpA libre. Cet épitope est localisé au niveau de la séquence A alpha 1-7 et les résidus glu 5 et gly 6 sont nécessaires (143, 187).

b) Epitopes localisés au niveau de la fraction C terminal de la chaîne A alpha

Cette partie de la molécule peut être isolée du fibrinogène par clivage à l'aide du bromure de cyanogène et correspond à la chaîne alpha du fragment Hi2-DSK ou FCB3. Le poids moléculaire de ce fragment de chaîne alpha est de 28.000 (76). Ce fragment fait partie d'un fragment plus gros (poids moléculaire 48.000 daltons) de la chaîne alpha détaché de la molécule de fibrinogène par la plasmine. Trois épitopes ont pu être localisés et exprimés aussi bien dans le fragment de poids moléculaire 48.000 que dans le fragment de poids moléculaire 28.000. Un de ces épitopes est localisé dans le fragment alpha 253-268, un autre dans le peptide alpha 540-554 (187). Enfin le troisième épitope est immunochimiquement homologue, ou réagit de la même façon avec l'anticorps qu'un épitope localisé au niveau de la chaîne gamma. Cet épitope a été décrit sous le nom de DEDS alpha (34).

2) Epitopes au niveau de la chaîne B beta

Différents peptides peuvent être détachés de la chaîne B beta dans des circonstances bien définies. Le fibrinopeptide B (fpB) (181, 188) est libéré du fibrinogène lorsque celui-ci est soumis à l'action de la thrombine. Il est formé de 14 amino-acides et selon la nomenclature officielle, le fpB est connu sous le nom de fragment B beta 1-14.

La plasmine attaque également la fraction N terminal de la chaîne B beta, mais les fragments libérés sont plus gros que le fpB, comme il est exposé au chapitre concernant la dégradation du

fibrinogène par la plasmine. Différents épitopes ont pu être individualisés au niveau de l'extrémité N terminal de la chaîne beta.

Épitopes au niveau du fpB

- Le fpB renferme deux épitopes (181, 188).

Le premier est dépendant de l'Asp 5 et de l'Asn en 6, mais est également influencé de façon variable par l'Arg 14 en position C terminal du fpB.

Le deuxième épitope dépend de la séquence Glu 7 - Glu 8. La structure terminée par l'Arg 14 entre également en jeu.

Ces faits sont importants à considérer du point de vue pratique, car in vivo le fpB perd très rapidement l'Arg 14 du fait de la présence de carboxy-peptidase ce qui est très bien objectivé par HPLC (111). Les épitopes permettant de reconnaître le fpB étant plus ou moins dépendants de l'Arg 14, le dosage du fpB ne peut pas servir de marqueur à une activation de la coagulation. Pour que le dosage du fpB puisse être utilisé comme marqueur de l'activation de la coagulation, il faudrait préparer un anticorps dirigé contre le fpB 1-13 (donc dépourvue en arginine) (47).

- Le fragment B beta 1-42 représente un marqueur de l'attaque du fibrinogène par la plasmine.

On peut considérer que, à des stades précoces de la dégradation par la plasmine du fibrinogène ou de la fibrine I, le fragment B beta 1-42 est libéré (25, 123, 153, 180). Cependant dès que la fibrine I se transforme en fibrine II, après libération du fpB, la liaison B beta 42-43 devient moins accessible au clivage par la plasmine (151). Cependant, la dégradation plasminique conduit alors au fragment beta

15-42 et peut être beta 21-42. Le fragment B beta 1- 42 renferme au moins 4 épitopes (145), au niveau des fragments B beta 1-14, B beta 1-21, B beta 15-42 et également B beta 21-42.

Pour différencier le fpB (B beta 1-14) et le fragment B beta 1-42, Nossel a proposé de doser l'immunoréactivité avant et après addition de thrombine (145). L'augmentation de réactivité du fpB après action de la thrombine permet d'évaluer le fragment B beta 1-42. Ce procédé est basé sur le fait que l'immunoréactivité du fragment B beta 1-14 est nettement diminuée quant le fpB fait partie d'une longue séquence comme le fragment B beta 1-42. Cette différence de réactivité peut être expliquée, soit par un masquage d'épitope du fpB par la séquence B beta 15-42, soit par un changement de conformation. La réactivité du fragment B beta 1-42 vis-à-vis de l'anticorps anti fpB est donc très sérieusement augmentée quand le fragment B beta 1-42 est soumis à l'action protéolytique de la thrombine.

3) Épitopes au niveau de la chaîne gamma

Quand des anticorps anti-fibrinogène sont préparés, les anticorps réagissant avec la chaîne gamma représentent seulement moins de 10 % des anticorps obtenus. En outre, les anticorps préparés en immunisant les animaux avec la chaîne gamma isolée, réagissent faiblement avec le fibrinogène intact (75, 157). En effet, sur les 11 à 13 épitopes présents sur la chaîne gamma, seul 2 ou 3 sont exprimés dans le fragment natif.

Les différents épitopes peuvent être classés en différents groupes, comme le montre la figure 15.



Fig. 15 : Distribution des différents épitopes connus sur la chaîne gamma du fibrinogène (d'après Plow et Edgington, *Seminars in Thromb. and Haemost.* 1982, 8, 36).

a) Epitopes présents dans la région N terminal de la chaîne gamma au niveau du domaine E de la molécule de fibrinogène et dans la zone proximale des zones hélicoïdales. Des anticorps ont été produits contre ces fragments et ont permis la caractérisation d'épitopes à ce niveau (35). Ces épitopes sont bien accessibles sur la chaîne gamma mais ils n'apparaissent pas sur la molécule de fibrinogène intacte. En effet, dans la molécule de fibrinogène, les épitopes sont masqués dans les zones hélicoïdales ou dans le fragment E au niveau des boucles formées par des ponts disulfures inter-chaînes. Parmi ces 4 épitopes, la structure de l'un d'entre eux ayant les caractéristiques d'un néo-antigène E, a pu être précisée et est constituée du peptide gamma 36-54 (48, 158). Ces épitopes deviennent accessibles après l'élimination du fragment B beta 1-42 par la plasmine.

b) Epitopes présents dans la région centrale de la chaîne gamma (gamma 95-264) correspondant à un fragment de chaîne gamma obtenu par dégradation par le bromure de cyanogène. Au moins 5 épitopes présents dans des fragments tryptiques du gamma 95-264 ont pu être identifiés par Fair (50) localisés respectivement en gamma 95-108, 109-194, 198-247, 248-256 et 257-264.

Tous ces épitopes, bien que présents dans la molécule de fibrinogène, sont peu accessibles à l'anticorps dans le fibrinogène intact. La réactivité n'apparaît qu'après dégradation plasminique et elle augmente encore après séparation des chaînes.

Parallèlement Plow et al. ont décrit un D néo antigène (154, 155) dont l'épitope est localisé dans le fragment gamma 160-197. Cependant, il est difficile de savoir si ce D néoantigène correspond à un des antigènes décrits par Fair.

Enfin, Cierniewsky et al. (34) ont décrit le DEDS-Gamma, il s'agit d'un épitope localisé au niveau de la chaîne gamma, et l'expression de cet épitope est dépendant de l'interaction entre le fragment D et E. En effet, il est présent sur le complexe entre le fragment D et le fragment E, par contre il est totalement absent dans le fragment D et le fragment E pris isolément. L'expression de cet épitope est dépendant d'interactions qui peuvent se constituer entre les deux domaines.

c) Epitopes localisés à l'extrémité C terminal de la chaîne gamma partie de la molécule renfermant les sites de covalence induits par le facteur XIIIa entre différentes molécules de fibrine

Lahiri et al. (112) d'une part, et Budzynski et al. (26) d'autre part, ont obtenus des anticorps en immunisant des lapins avec la fraction C terminal de la chaîne gamma dimérisée. Les anticorps obtenus réagissent préférentiellement avec les dimères de chaîne gamma, mais ne réagissent que très faiblement avec la fraction C terminal de la chaîne gamma à l'état de monomère. Ces anticorps reconnaissent un antigène qui est plus exprimé sur la molécule de fibrine stabilisée que sur la fibrine non stabilisée, cet épitope étant localisé au niveau de l'extrémité C terminal des chaînes gamma.

B. MODELES PROPOSES POUR EXPLIQUER L'APPARITION DE NEO-ANTIGENES

Il apparaît ainsi que certains épitopes ne sont pas exprimés à l'extérieur de la molécule de fibrinogène, mais peuvent apparaître, soit après dégradation, soit après modification allostérique, soit après agrégation de fragments par des liaisons de covalence. Trois mécanismes différents ont pu être proposés pour expliquer l'apparition de ces néo-antigènes, qui apparaissent après clivage.

1) Néoantigènes apparaissant aux sites de clivage par l'enzyme (115)

2) Néoantigènes pouvant être liés à un changement de conformation de la molécule : une nouvelle conformation pouvant à elle seule induire la formation d'un nouvel épitope (190).

3) Démasquage d'épitopes qui étaient masqués du fait de l'encombrement stérique (48, 158, 159).

Les néoantigènes décrits dans la littérature ont été localisés au niveau du fragment D et au niveau du fragment E (155).

- Les D néoantigènes sont localisés au niveau de la chaîne gamma dans la fraction centrale gamma 95-264. Un D néoantigène découvert par Edgington a été identifié dans la séquence 160-197.

- Le E néoantigène a été également localisé dans la chaîne gamma et correspond au fragment gamma 36-53.

- Enfin, des marqueurs de la dimérisation du fragment D ont pu être mis en évidence.

La réaction de transamidation se fait entre une lysine et une glutamine de deux chaînes gamma de deux fragments différents (31, 178). La dimérisation des chaînes gamma induit un alignement des deux chaînes gamma, alignement anti-parallèle. La nouvelle structure créée par cet alignement contient un néoantigène absent dans la chaîne gamma dissociée.

C. APPLICATION DE L'ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE DU FIBRINOGENE A L'ETUDE DE LA STRUCTURE TERTIAIRE DE LA MOLECULE. MODIFICATIONS DE STRUCTURE INDUITE PAR LA DEGRADATION DU FIBRINOGENE OU LORS DE LA FIBRINOFORMATION

La préparation d'un groupe d'anticorps reconnaissant des épitopes bien définis à l'intérieur de la molécule, permet d'apporter des précisions sur la configuration tertiaire de la molécule. Comme il a été établi par Plow et Edgington (160), les différents épitopes reconnus ont été placés dans le modèle trinodulaire du fibrinogène et à chaque fois il est noté si l'épitope est reconnu par les anticorps au niveau du fibrinogène natif ou si au contraire, l'épitope est masqué dans le fibrinogène natif. De plus, la reconnaissance des épitopes permet de préciser la fonction de ces structures dans la molécule de fibrinogène. Enfin, la reconnaissance d'épitopes permet de mettre en évidence des modifications de la molécule au cours de la fibrinoformation par exemple.

Différentes conclusions concernant la structure du fibrinogène ont pu être tirées de cette étude. La structure trinodulaire de la molécule de fibrinogène (43, 45) est actuellement admise par tous. Grâce aux études immunochimiques, il a pu être montré que le fibrinogène était en fait une molécule très flexible, puisque, bien que séparés par les structures hélicoïdales, les domaines D et E du fibrinogène sont intriqués. Cette association des fragments D et E dans la molécule de fibrinogène a été révélée par la mise en évidence d'un épitope présent dans la chaîne gamma, facilement mis en évidence dans le complexe D-E, mais absent du fragment D et du fragment E isolé (DEDS-gamma) (77).

Durant la fibrinoformation, les monomères de fibrine sont beaucoup plus rigides et ne se présentent que sous la forme allongée, permettant alors l'interaction des monomères entre eux pour former les fibres de fibrine (127), comme le montre la figure 16.

De plus, lors de la dégradation du fibrinogène, on assiste à une détorsion de la structure hélicoïdale. En effet, dans la molécule de fibrinogène, aucun épitope n'est exprimé, ni dans le fragment beta 75-115, ni dans le fragment gamma 19-78, car les chaînes sont fortement entrelacées (160). Lors de la dégradation du fibrinogène, certains épitopes localisés au niveau de ce fragment de chaîne gamma peuvent être démasqués. Ce démasquage d'épitopes a permis de suggérer que pendant la dégradation une détorsion des segments hélicoïdaux se faisait. En outre, un changement de conformation des différents domaines est observé pendant la dégradation, comme il a été prouvé par l'apparition de néoantigènes présents aussi bien sur le fragment D que sur le fragment E. Le néoantigène gamma 36-53 apparaît sur la molécule de fibrinogène dès que le fragment B beta 1-42 est libéré de

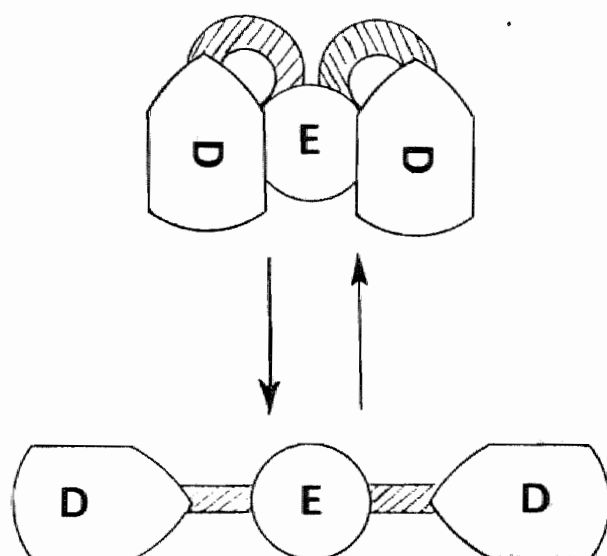


Fig. 16 : Flexibilité de la molécule de fibrinogène
au cours de sa transformation en monomère de fibrine.

la molécule. Ce qui montre bien que cette libération conduit à une transition allostérique de la molécule avec apparition de nouvelles interactions à l'intérieur de la molécule.

Enfin, l'exploitation d'une telle étude immunochimique permet également d'apporter des modifications sur la conception classique de la fibrinoformation. En effet, il était admis que la fibrinoformation se faisait progressivement, puisque la libération du fpA devait aboutir à la formation de (des A) monomères de fibrine et il était suggéré que le départ de fpA de la molécule de fibrinogène était nécessaire pour le fpB soit libéré à son tour sous l'action de la thrombine (36). Cette hypothèse a été infirmé puisqu'il a été montré que la liaison b beta 14-15 était facilement accessible dans la molécule de fibrinogène (160). Les résultats de cette étude immunochimique sont d'ailleurs en bon accord avec ceux de Soria et al. qui ont montré par l'étude du fibrinogène Metz que le détachement du fpB pouvait se faire en l'absence de libération de fpA.

- Enfin, si de nombreux anticorps permettent de différencier le fibrinogène de ses produits de dégradation, peu d'anticorps ont été décrits permettant de différencier le fibrinogène de la fibrine. Des efforts ont été faits dans des directions différentes telle que la recherche d'anticorps réagissant avec des épitopes localisés au voisinage de la zone de clivage de la thrombine sur la chaîne A alpha et B beta.

Kwan et al (110) ont obtenu des anticorps en immunisant un animal dirigé contre le fragment de la chaîne beta qui fait suite au fpB. L'épitope reconnu par cet anticorps est masqué dans le fibrinogène et est très bien reconnu dans la fibrine. Cet anticorps ne

reconnaît pas non plus les produits de dégradation de la fibrine, car le fragment beta 15-42 est éliminé lors de l'attaque de la fibrine par la plasmine.

Des anticorps peuvent reconnaître des épitopes localisés au niveau de régions plus éloignées du site de clivage de la thrombine et qui seraient plus exposés dans la molécule de fibrine du fait des changements topographiques qui se produisent durant la fibrinoformation.

Enfin, les liaisons de covalence entre deux chaînes gamma conduisant aux dimères gamma, peuvent également faire apparaître des épitopes conformationnels, permettant de différencier la fibrine stabilisée du fibrinogène.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. PREPARATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL

A. PREPARATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE

Voir le paragraphe concernant les antigènes utilisés pour tester les surnageants.

B. IMMUNISATION DES SOURIS

Deux souris Balb/c âgées de six semaines ont été injectées au jour 1 (J1) avec 100 μ g de produits de dégradation de la fibrine en solution dans 0.3 ml de NaCl 0.15 M additionné d'une quantité égale d'adjuvant de Freund complet. Un tiers a été injecté intrapéritonéalement et les deux tiers restant en sous-cutané. Au jour 21 une deuxième injection de 100 μ g de produits de dégradation de la fibrine a été faite, puis 4 jours plus tard la rate a été prélevée stérilement et les cellules mises en suspension, afin d'être fusionnées avec la lignée de myélome.

C. PROTOCOLE DE FUSION

Nous avons fusionné deux fois 3×10^7 cellules de rate avec 5×10^7 cellules de myélome NS1 en utilisant pour cela la méthode décrite par Kohler et Milstein en 1975 et modifiée par Fazekas de St Groth. Le

protocole était donc le suivant (51, 106, 107).

Le jour précédant la fusion :

1) On prépare des milieux stériles suivants : 30 ml de sucrose (0,34 M), 100 ml de milieu standard composé de RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal, 200 ml de milieu HAT (milieu standard + hypoxanthine 10^{-4} M + aminoptérine 4×10^{-7} M et thymidine $1,6 \times 10^{-3}$ M, 2 % de glutamine 200 mM, 1 % de pyruvate de Na 100 mM et 100 unités de Pénicilline + 50 μ g de streptomycine par ml), 2 ml de solution de fusion à 2 g de PEG 4000 pour 2 ml d'eau distillée, solution stérilisée à l'autoclave.

2) On prépare les macrophages à partir de 5 souris Balb/c en rinçant leur cavité péritonéale avec 5 ml de la solution de sucrose. Les macrophages sont réunis et comptés, puis centrifugés pendant 10 mn à 200 G avant d'être remis en suspension dans du milieu HAT à la concentration de 6×10^6 macrophages par ml. 100 microlitres de cette suspension sont distribués dans les trous de microplaques de culture et placés dans un incubateur à CO₂ sous une humidité de 85 % et une pression partielle de CO₂ de 7 %.

Le jour de la fusion :

1) Les cellules myélomateuses en culture sont récupérées par centrifugation des suspensions cellulaires dans des tubes de 50 ml. Les culots sont réunis dans un tube qui est rempli avec 50 ml de milieu standard, les cellules sont comptées, recentrifugées pendant 10 mn à 200 G et mises en suspension dans volume de milieu RPMI tel que les cellules soit à 10^6 cellules par ml.

2) Les cellules de la rate prélevées stérilement sont également

lavées une fois dans 50 ml de ClNa 0,15 M et centrifugées pendant 10 mn à 200 G. Les cellules sont remises en suspension en ClNa 0,15 M de manière à avoir 10 cellules par ml.

Ces deux étapes sont réalisées parallèlement, à la température du laboratoire, dans une hotte à flux laminaire.

3) La fusion est réalisée en mélangeant 5 ml de suspension de cellules de myélome avec 3 ml de la suspension de cellules spléniques dans un tube de 50 ml rempli avec du RPMI ou du milieu standard. La suspension ainsi obtenue est centrifugée à 200 G pendant 10 mn. Après avoir enlevé le surnageant et remis le culot en suspension, on ajoute 1 ml de la solution de fusion, goutte à goutte en 1 mn, en agitant le tube de façon constante et en le plongeant ensuite pendant 90 secondes dans un bain-marie à 37 C. On arrête la fusion en ajoutant lentement 20 ml de milieu standard ou RPMI dans des conditions bien déterminées : 1 ml les premières 30 secondes, 3 ml pendant les 30 secondes suivantes et le reste pendant la deuxième minute. Le tube est ensuite rempli avec le milieu standard et laissé au repos pendant 5 mn, puis centrifugé pendant 10 mn à 200 G. Le culot cellulaire est alors lavé par 50 ml de milieu standard. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 50 ml de milieu HAT par un pipetage doux en évitant de détruire les agrégats. La suspension cellulaire est alors distribuée dans les microplaques à raison de 100 microlitres par puits et les microplaques sont replacées dans l'incubateur à CO_2 .

Les jours suivants la fusion :

Les hybridomes sont surveillés régulièrement. Au jour 6 après la fusion, 50 % du surnageant de chaque puits est remplacé par du milieu

HAT, au jour 10, les colonies sont visibles à l'oeil nu. Les surnageants peuvent être testés entre le 10e et le 14e jour.

D. PRESERVATION DES CLONES, CONGELATION

Les cellules des puits contenant une sécrétion intéressante sont transférés immédiatement dans les puits de macroplaques de cultures à 24 puits et donc chacun a été rempli par 2 ml de milieu HAT. Dès que les cellules ont atteint 50 % de la confluence dans ces macroplaques, elles sont clonées et reclonées afin d'être sûr de préserver la sécrétion. Les clonages sont effectués à la dilution limite. Les lignées cellulaires parentales, c'est à dire avant clonage, sont congelées après les avoir fait proliférer en flacon dans un volume de milieu standard de 10 ml, afin de congeler une quantité suffisante de cellules. La congélation est effectuée de la manière suivante : les cellules sont centrifugées puis remises en suspension dans 1 ml de sérum de veau foetal contenant 5 % de DMSO. Les cellules sont alors distribuées dans trois ampoules de 2 ml en polystyrène et placées pendant une nuit dans un congélateur à -80°C , avant d'être transférées dans un conteneur d'azote liquide.

E. PREPARATION DES ASCITES RICHES EN ANTICORPS

Elle est réalisée par injection des cellules d'hybridome produisant un anticorps préalablement sélectionné. Une semaine avant l'injection des cellules, 0,5 ml de pristane est administré à une

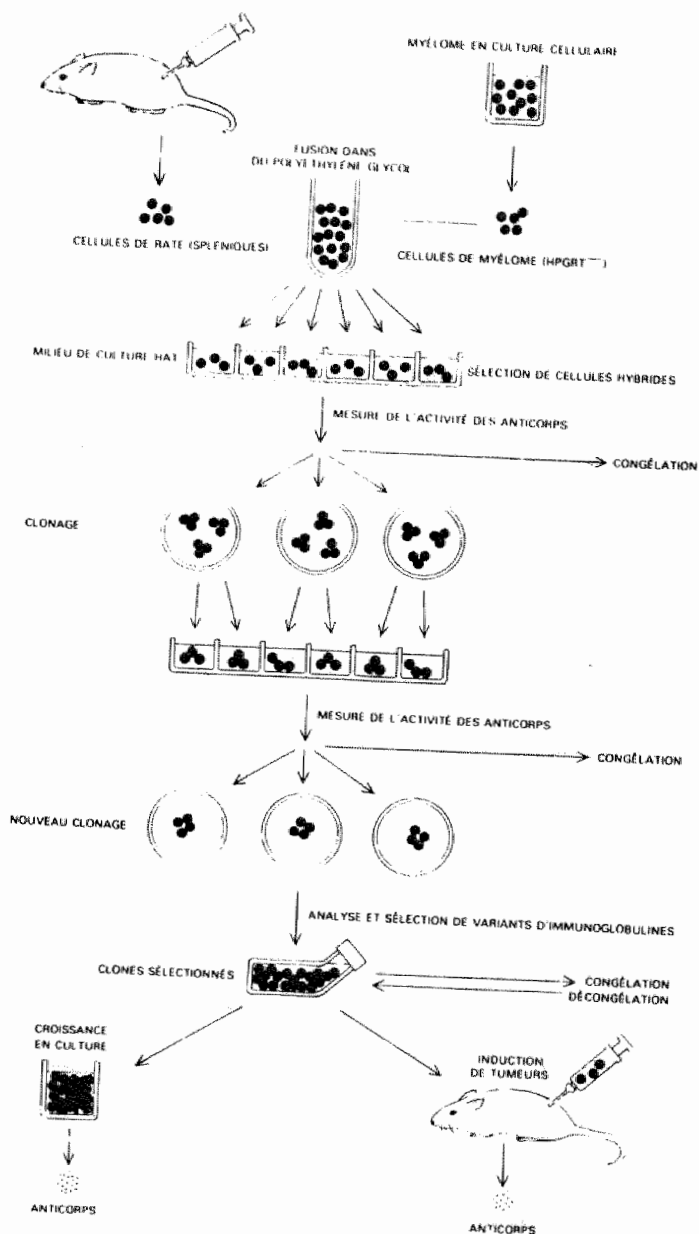


Fig. 17 : Schéma des différentes étapes de l'obtention d'anticorps monoclonaux.
(d'après Milstein pour la Science, 1980).

souris Balb/c en injection intrapéritonéale dans le but de créer une irritation locale. Huit jours plus tard, 10 millions de cellules d'hybridomes sont mises en suspension dans 1 ml de sérum physiologique et la suspension cellulaire injectée intrapéritonéalement à la souris, préalablement traitée par le pristane. L'ascite apparaît 10 jours après l'injection de cellules et les prélèvements d'ascite sont effectués régulièrement.

Le schéma de l'obtention des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux est représenté dans la figure 17.

II. METHODES UTILISEES POUR LA SELECTION DES LIGNEES

Pour déterminer la spécificité des anticorps sécrétés et évaluer leur titre, nous avons choisi l'immuno-enzymologie.

A. PRINCIPE DE LA METHODE IMMUNO-ENZYMOLOGIQUE

Dans un premier temps les surnageants à tester sont incubés en présence de tween avec différents antigènes fixés sur un support solide. Dans ces conditions expérimentales, seuls les anticorps vont se fixer à l'antigène immobilisé et il n'y a pas de fixation non spécifique d'autres protéines, du fait de la présence de tween.

Dans un deuxième temps, l'anticorps (Ig de souris) susceptible d'être fixé à l'antigène immobilisé est révélé par une Ig de chèvre anti Ig de souris marqué à la peroxydase. L'activité de la peroxydase fixée sur le support est alors mesurée en utilisant un substrat

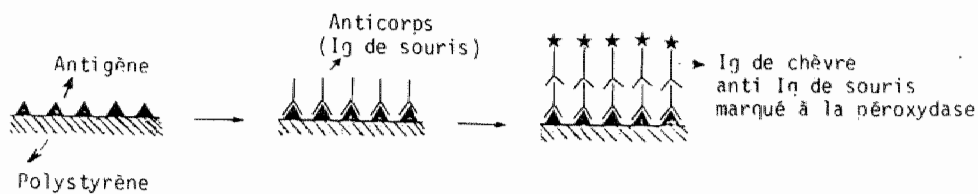


Fig. 18 : Schéma de la réaction Immuno-enzymologique utilisé pour tester les surnageants de culture

chromogène en présence d'eau oxygénée. La réaction est schématisée dans la figure 18.

B. MATERIEL

1) Le support solide choisi pour fixer l'antigène a été les plaques de polystyrène Dynatech M 29 B à 96 puits pour microELISA, car la fixation de l'antigène sur ces plaques est très reproductible. De plus, ce support est traité par irradiation aux rayonnements gamma, ce qui permet une meilleure capacité d'absorption que celle se produisant sur les mêmes supports non traités.

2) Antigènes utilisés pour tester les surnageants

a) Fibrinogène humain (Laboratoire Kabi, Stockholm).

b) Fragment de dégradation du fibrinogène.

Les fragments D et E ont été isolés selon la technique de Nilhen (140). La dégradation du fibrinogène a été réalisée en incubant 10 ml d'une solution de fibrinogène à 10 mg/ml dans du chlorure de sodium 0,15 M, phosphate 0,05 M, pH 7,35, avec deux unités de plasmine (laboratoire Novo) à 37 °C pendant 8 heures.

A la fin de cette période d'incubation, la solution dégradée de fibrinogène est dialysée à 4 °C contre du tampon phosphate 0,01 M, pH 8,2. La séparation des fragments D et E est alors effectuée par chromatographie échange d'ions. A cet effet, l'échantillon est appliqué sur une colonne de DEAE cellulose de 20 x 2,5 cm puis élué en gradient de force ionique, le tampon initial étant du tampon phosphate

0,01 M, pH 8,6 et le tampon final du tampon phosphate 0,3 M, pH 8,6. Dans de telles conditions, le fragment D est élué au début du gradient, tandis que le fragment E est élué avec le tampon final.

Pour obtenir les fragments D1, la dégradation du fibrinogène par la plasmine est réalisée en milieu Cl2 Ca : à 2 ml de solution de fibrinogène à 6,5 mg/ml dans du NaCl 0,15 M, sont ajoutés 0,25 ml Cl2 Ca M/4 et 0,5 ml de plasmine à 2 u/ml.

Après 2 heures d'incubation à 37°C, 0,4 ml de plasmine à 2u/ml sont de nouveau ajoutés à la solution. Après 2 nouvelles heures d'incubation à 37 °C, la plasmine est éliminée par chromatographie sur sépharose lysine (laboratoires Pharmacia) en tampon tris 0,05 M pH 7,4.

La solution renfermant les fragments D et E est alors soumise à une dialyse contre du tampon tris 0,01 M pH 8,6 et la séparation des fragments D et E est réalisée selon Nilhen par chromatographie sur DEAE cellulose : l'échantillon est appliqué sur une colonne de DEAE cellulose de 10 x 1 cm, puis l'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de tampon tris, le tampon initial étant du tampon tris 0,01 M pH 8,6, et le tampon final du tampon tris 0,5 M pH 8,6.

Le fragment D1 est élué dans le premier pic. Le fragment E est élué dans le deuxième pic. Les deux pics correspondants aux fragments D1 et E sont soumis à une dialyse contre du chlorure de sodium 0,15 M.

Pour obtenir le fragment D3, la dégradation du fibrinogène est réalisée en milieu EDTA (10 mM) puis la séparation est effectuée comme précédemment.

Le contrôle de pureté de ces différents fragments est effectué :

- Par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % en présence de SDS selon la technique de Weber et Osborn (185),
- Par dosage immuno-enzymologique par méthode ELISA, selon Engwall et Carlsson (49).

Le protocole utilisé sera exposé dans le paragraphe sur les conditions expérimentales concernant le contrôle de la fixation d'un antigène sur une plaque de polystyrène. Dans ces conditions opératoires et compte tenu de la très grande sensibilité de dosage, il peut être affirmé que les fragments D, D1 et D3 isolés ne sont pas contaminés par du fragment E, les fractions isolées de fragments D ne réagissant pas avec les Ig anti fragment E immobilisés. Cette technique ELISA nous a permis en outre de déterminer la teneur en fragment D1 et D3 dans les fractions obtenues.

c) Produits de dégradation de la fibrine

Ils sont obtenus selon le protocole de Gaffney et al. (68, 69) après digestion partielle (50 %) d'un caillot de fibrine stabilisé. Cette obtention se fait en différentes étapes :

1) Préparation d'un caillot de fibrine stabilisé

A une solution de fibrinogène humain Kabi à 3 mg/ml en solution dans du chlorure de calcium 40 mM, sont ajoutés du facteur XIII (fibrogamine, Laboratoire Behring) de manière à avoir une concentration finale en facteur XIII dans la solution identique à celle présente dans le plasma normal, puis de la thrombine (Behring) à la dose de 5 u/ml. Après une incubation de 2 heures à 37°C, le caillot est lavé, essoré.

2) Lyse du caillot

Les caillots ainsi lavés sont incubés dans une solution de plasmine (Laboratoire Kabi) à 2 u/ml (ou dans une solution de plasminogène, puis dans une solution de streptokinase). Lorsque le caillot est lysé de 50 % environ, la solution surnageante renfermant les produits de dégradation de la fibrine est récupérée, puis débarassée de plasmine par filtration sur une colonne de sépharose lysine (Pharmacia)

3) Séparation des complexes de dégradation de la fibrine

Elle est réalisée par chromatographie sur colonne de sépharose 4B (Pharmacia), l'élution étant réalisée à l'aide d'un tampon tris HCl 0,1 M, pH 8,5. Au V₀ de la colonne sont élués les complexes de haut poids moléculaire, tandis que les complexes DDE sont élués plus tardivement. La teneur en produits de dégradation de la fibrine dans chaque pic est évaluée d'après la densité optique à 282 nm d'une part et par agglutination de particules de latex sensibilisées avec de l'antifibrinogène (laboratoire Stago, Anières, France).

Les produits de dégradation de la fibrine ainsi isolés ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 4 % en milieu non dissociant selon la technique de Davis (42). Ils sont constitués essentiellement de complexes de dégradation de la fibrine. Toutefois une petite quantité de fragment D et de fragment E libres est présente dans les échantillons, phénomène également retrouvé par Gaffney (69). Cependant cette quantité de fragments D et E libres dans les échantillons ne dépasse jamais 15 %.

d) Chaînes isolées du fibrinogène :

Leur obtention a été réalisée par technique échange d'ions sur CM cellulose selon la technique de Henschen et Edman (89) après

dissociation des chaînes par le mercaptoethanol et l'urée suivie d'une carboxymethylation de ces chaînes.

e) Monomères (des A - des B) de fibrine :

Leur préparation est effectuée par dissolution dans l'urée 4M d'un caillot obtenu par coagulation par 2 u de thrombine de 1 ml d'une solution de fibrinogène à 10 mg/ml dans une solution d'EDTA 1 mM. La teneur en monomères dans la solution est évaluée d'après la densité optique à 282 nm.

3) IgG isolées à partir d'un antisérum commercial préparé chez le lapin : leur isolement a été effectué par chromatographie sur DEAE selon la technique de Corthier et al. (38).

Les antisérums anti fibrinogène, anti D et anti E proviennent du laboratoire Stago.

4) IgG marquées à la peroxydase

Le marquage des Ig a été réalisé par la technique en deux temps d'Avrameas (4).

5) Autres réactifs ou matériel utilisé

- Ig de chèvre anti Ig de souris marqué à la peroxydase (laboratoire EY)
- Tween 20, albumine bovine (fraction V), orthophénylène diamine (Sigma)
- Dynawasher automatique : appareil automatique de lavage de plaques
- Spectrophotomètre adapté à la lecture automatique directe de la

densité optique au niveau de chaque cupule de la plaque : autoreader Dynatech MR 580, cet appareil présente l'avantage d'être un lecteur à double longueurs d'onde, ce qui permet d'éliminer tout bruit de fond causé par les imperfections au niveau des supports plastiques.

- Replicateur : portoir de 96 tulipes de 50 μ l permettant de recueillir simultanément les liquides surnageants au niveau des 96 puits de la plaque de polystyrène (Dynatech).

6) Tampons utilisés par la réaction immuno-enzymologique

- Le tampon servant à dissoudre les protéines destinées à être fixées sur la plaque de polystyrène (ou tampon de "coating") consiste en du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

- Le tampon PBS-Tween utilisé dans la réaction antigène-anticorps consiste en du chlorure de sodium 0,135 M-phosphate 0,0175 M, pH 7,4 contenant 1/1000 d'albumine bovine et 0,5/1000 de tween 20.

- Le même tampon contenant 1/1000 de tween 20 est également utilisé pour les dilutions au 1/2 de manière à ce que la concentration finale en tween 20 soit toujours de 0,5/1000. Le tween 20 est ajouté au tampon pour éviter les adsorptions non spécifiques sur la plaque de polystyrène, tandis qu'à cette concentration le tween 20 n'inhibe pas la réaction antigène-anticorps.

- La solution de lavage des plaques de polystyrène consiste en du ClNa 0,15 M renfermant 0,5/1000 de tween 20.

- Le tampon pH 5 de dissolution de l'orthophénylène diamine (OPD) est constitué d'acide citrique 0,05 M - phosphate disodique 0,1 M.

- Le réactif destiné à révéler la peroxydase est constitué par une solution d'OPD à 40 mg/100 ml de tampon phosphate citrate pH 5, renfermant 40 μ l de perhydrol à 30 % (193).

C. PROTOCOLE OPERATOIRE

1) Immobilisation de l'antigène sur la plaque de polystyrène

a) Cas où l'antigène est soluble

L'antigène est immobilisé sur la plaque de polystyrène par addition dans chaque puits de 200 μ l de solution protéique à 1 μ g/ml dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Après une incubation de 18 heures à 37°C, la solution surnageante est éliminée puis la plaque est soumise à 4 lavages successifs avec 300 μ l par puits de la solution de lavage. Différentes plaques sont réalisées, plaques contenant du fibrinogène immobilisé, ou du fragment D, ou du fragment E ou des produits de dégradation de la fibrine (PDFb).

Au cours d'expériences préliminaires, après incubation de 18 heures à 37°C des différentes solutions protéiques avec la plaque de polystyrène, les solutions ont été récupérées afin de déterminer la quantité résiduelle de protéine susceptible de se trouver dans ces solutions. A cet effet une réaction ELISA a été réalisée selon la technique d'Engwall et Carlsson (49). Dans les conditions expérimentales que nous avons déterminées [dans un premier temps fixation d'Ig purifiés provenant d'un anti-sérum antifibrinogène, ou anti-fragment D, ou anti-fragment E, sur la plaque de polystyrène réalisée par incubation 18 heures à 37°C d'une solution à 10 μ g/ml d'Ig purifiée dans du tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6 suivie de 4 lavages de la plaque, dans un deuxième temps incubation des Ig immobilisés avec la solution susceptible de renfermer le fibrinogène, le fragment D et le fragment E renfermant du tween et dans un

troisième temps révélation du fibrinogène, du fragment D ou du fragment E par des Ig marquées à la peroxydase utilisées à la dilution optimale (1/50 dans nos conditions)].

Il a pu être démontré ainsi que toute la quantité de protéine incubée avec le polystyrène est fixée dans les conditions choisies, car après incubation, les solutions surnageantes renferment des quantités d'antigène résiduel inférieures à 50 ng/ml.

b) Cas où l'antigène est insoluble dans le tampon phosphate, mais soluble en urée 4M.

Le protocole utilisé est celui décrit par Stanilawski et al. (174).

- Une activation préalable des plaques de polystyrène est nécessaire. Elle est réalisée par une incubation de 2 heures à 50°C des plaques, avec une solution de glutaraldehyde à 0,025 % dans du CO_3Na_2 pH 9, 0,1 M (100 μl /puits) suivi de 3 lavages à l'eau distillée.

- L'immobilisation de la protéine a lieu en incubant 18 heures à 37°C

100 μl de la solution protéique en solution dans l'urée 4M. La solution d'urée 4M est obtenue par dissolution d'urée dans l'eau distillée, puis le pH est amené à pH 7,5. Les antigènes insolubles utilisés ont été respectivement : les chaînes A alpha, B beta et gamma utilisées à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans l'urée 4M et les monomères utilisés aux concentrations de 10 $\mu\text{g/ml}$ et de 5 $\mu\text{g/ml}$ dans l'urée 4M.

Comme pour le cas de l'antigène soluble, après ce temps d'incubation, la solution protéique est éliminée, puis la plaque est soumise à 4 lavages successifs dans la solution de lavage.

2) Réaction antigène-anticorps

a) Prélèvement des surnageants :

Pour automatiser le prélèvement nous avons mis au point une technique rapide utilisant le répliqueur, permettant ainsi de tester simultanément les 96 puits de la plaque de culture d'hybridomes. Cette technique consiste à prélever en même temps 50 μ l de chaque surnageant d'une plaque de culture à l'aide de répliqueur à 96 tulipes qui est adapté à cette plaque et préalablement stérilisé à la flamme puis refroidi. Les surnageants sont alors transférés dans une plaque à 96 puits renfermant 50 μ l de tampon PBS-tween 1/1000 par simple apposition du répliqueur au niveau de la plaque. Cette plaque est appelée plaque de transfert. Chaque puits de cette plaque de transfert contient donc 50 μ l de surnageant de culture dilué au 1/2 et l'emplacement de chaque surnageant correspond à l'emplacement des surnageants de la plaque où a été réalisé l'hybridation.

Dans chaque puits de la plaque de transfert sont ajoutés 200 μ l de tampon PBS tween - 0,5/1000 réalisant une dilution finale du surnageant au 1/10.

b) Réaction antigène-anticorps

50 μ l de chaque dilution au 1/10 de ces surnageants présents dans les 96 puits de la plaque de transfert sont prélevés de nouveau à l'aide du répliqueur et disposés dans les puits correspondants d'une plaque où l'antigène a été immobilisé et dans lesquels auront été disposés au préalable 50 μ l de tampon PBS tween. Par cette technique les anticorps sont testés en même temps vis-à-vis des différents antigènes répartis dans différentes plaques.

Dans notre protocole les différents surnageants de culture sont

Dans notre protocole les différents surnageants de culture sont testés simultanément sur du fibrinogène immobilisé (1ere plaque), du fragment D (2eme plaque), du fragment E (3eme plaque), des complexes de dégradation de la fibrine stabilisée (4eme plaque).

Après une incubation de 2 heures à 37 °C des différents surnageants avec les antigènes immobilisés, les surnageants sont éliminés et les plaques lavées 4 fois avec la solution de lavage.

c) Détection des anticorps liés à l'antigène immobilisé.

A chaque puits sont ajoutés 200 µl d'une dilution au 1/1000 (dans le tampon PBS tween 0,5/1000) d'Ig de chèvre anti Ig de souris marqués à la peroxydase.

Après 2 heures d'incubation à 37°C les plaques sont lavées 4 fois, puis l'anticorps marqué à la peroxydase fixé sur la plaque est évalué par dosage de la peroxydase réalisé en ajoutant 200 µl de la solution d'OPD. Après exactement 3 minutes d'incubation, la réaction est bloquée par addition dans chaque puits de 50 µl d'acide sulfurique 2,5 N. La coloration développée au niveau de chaque puits est évaluée par mesure de la D.O. à 492 nm en utilisant l'autoreader.

d) Certains surnageants sélectionnés ont été testés sur les chaîne A alpha, B beta et gamma immobilisées, ainsi que sur les monomères immobilisés.

III. METHODE IMMUNO-ENZYMOLOGIQUE UTILISEE POUR ETUDIER LA REACTIVITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL VIS-A-VIS DE L'ANTIGENE EN SOLUTION

Une étude immuno-enzymologique par compétition en deux temps est réalisée selon le protocole décrit par Soria et al. pour le dosage du fibrinopeptide A (112).

A. PRINCIPE DE LA REACTION.

Il est représenté dans la figure 19. La fixation de l'anticorps à l'antigène immobilisé est inhibée de façon compétitive par l'antigène en solution. Il existe une relation inverse entre la quantité d'antigène solubilisé incubé avec anticorps, et la quantité d'anticorps qui se fixera secondairement sur l'antigène immobilisé.

B. MATERIEL

Les réactifs utilisés sont identiques à ceux de la technique précédente.

C. PROTOCOLE

La technique se fait en différentes étapes :

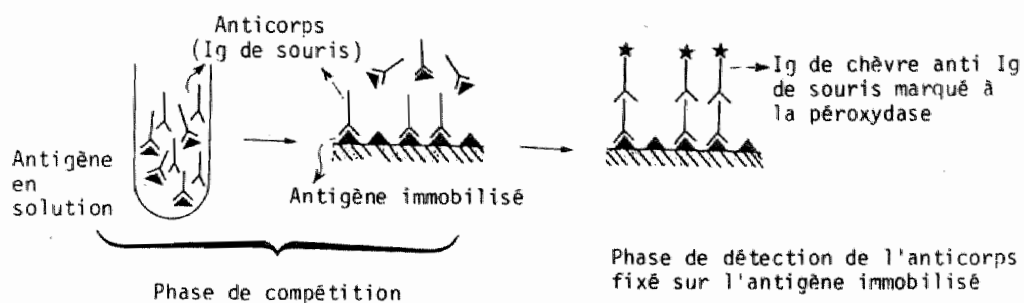


Fig. 19 : Réaction de compétition antigène-anticorps entre antigène en solution et antigène immobilisé.

1) Détermination de la dilution d'anticorps à utiliser

Sur les plaques de polystyrène où l'antigène a été immobilisé, sont distribués dans chaque puits 200 μ l de dilutions progressives d'anticorps dans le tampon PBS tween 0,5/1000. Les dilutions utilisées sont de 1/10 à 1/5120 pour les surnageants de culture et de 1/500 à 1/128000 pour les ascites.

- Après 2 heures d'incubation les plaques sont lavées 4 fois comme précédemment et la quantité d'anticorps fixé à la plaque est évaluée selon le protocole décrit préalablement pour la sélection des lignées en ajoutant 200 μ l d'Ig de chèvre anti Ig de souris marquées à la peroxydase, puis en déterminant l'activité de la peroxydase liée à la plaque.

La dilution d'anticorps à utiliser dans l'épreuve de compétition est celle qui correspond à 80 % de la fixation maximale dans les conditions opératoires. D'après la courbe d'étalonnage de l'anticorps établie en portant en abscisses (en échelle logarithmique) l'inverse de la dilution d'anticorps, et en ordonnées (en échelle arithmétique) la D.O. correspondant à l'activité de la peroxydase reflet de la fixation d'Ig anti Ig de souris marquées à la peroxydase.

2) Etape de compétition entre antigène soluble et antigène immobilisé pour se lier à l'anticorps

a) Réaction de compétition

La réaction de compétition est effectuée en deux temps. Les expériences sont réalisées dans des tubes à hémolyse en verre, à usage unique.

- Dans un premier temps 450 μ l de dilutions progressives en tampon PBS

tween d'antigènes (concentrations en antigènes allant de 100 $\mu\text{g/ml}$ à 375 ng/ml) sont préincubés 18 heures à 4°C avec 50 μl de surnageant de culture (ou d'ascite) utilisé à une dilution finale dans la mixture d'incubation correspondant à celle préalablement déterminée, (la dilution de l'anticorps étant également réalisée en tampon PBS tween).

Différents antigènes sont testés parallèlement :

- le fibrinogène
- le fragment D ou le fragment E (selon que l'épitope révélé par cet anticorps soit situé dans le domaine D ou dans le domaine E de la molécule)
- les produits de dégradation de la fibrine stabilisée.

Après le temps d'incubation, les tubes sont centrifugés.

- Dans un deuxième temps 200 μl de chaque échantillon ainsi incubé avec l'antigène en solution sont déposés dans les différents puits de la plaque de polystyrène où est immobilisé l'antigène. Après 2 heures d'incubation à 37 °C, les surnageants sont éliminés et les plaques lavées 4 fois dans les conditions déjà décrites.

b) Evaluation de la quantité d'anticorps fixé sur l'antigène immobilisé.

La quantité d'anticorps fixée au niveau de chaque puits est évaluée par la même technique que celle utilisée pour tester les anticorps. La droite d'étalonnage est tracée sur du papier semi logarithmique, en portant en abscisses la quantité d'antigène en solution incubé avec l'anticorps (en échelle logarithmique) et en ordonnées la D.O. traduisant l'activité de la peroxydase et représentant donc la quantité d'anticorps fixé à la plaque (échelle arithmétique).

IV. METHODE UTILISEE POUR JUGER DE LA REACTIVITE DES ANTICORPS VIS-A-VIS DES AUTRES PROTEINES PLASMATIQUES

En effet, un anticorps monoclonal réagissant avec un seul épitope de la molécule , il se pourrait que cet épitope puisse se retrouver dans d'autres protéines, autres que le fibrinogène et ses dérivés. Pour apprécier la réactivité des anticorps que nous avons sélectionné vis-à-vis des autres protéines plasmatiques, nous avons déterminé si l'incubation du surnageant de culture utilisé à la dilution optimale pendant 18 h à 4 °C avec le plasma d'un malade atteint d'afibrinogénémie congénitale (concentration plasmatique en fibrinogène 20 ng/ml) probablement dilué au 1/2 dans du PBS tween 1/1000 était capable d'inhiber la fixation des anticorps sur le fibrinogène (ou un de ses fragments de dégradation) immobilisé, selon de protocole opératoire de compétition exposé précédemment.

Le dosage du fibrinogène dans le plasma et les plaquettes de ce malade a été réalisé par la technique ELISA de Engwall et Carlsson (49), le fibrinogène à doser étant pris en sandwich entre les Ig antifibrinogène fixées sur un support solide et les Ig antifibrinogène marquées à la peroxydase.

Dans les conditions opératoires déjà exposées dans le paragraphe concernant le contrôle de l'immobilisation de l'antigène sur la plaque de polystyrène, la réaction est linéaire pour des concentrations allant de 10 ng/ml à 600 ng/ml de fibrinogène, ce qui permet de réaliser un dosage précis, sensible et reproductible du fibrinogène quand celui-ci est en faible concentration.

V. DETERMINATION DE LA CLASSE DES Ig OBTENUS PAR LES HYBRIDOMES

La classe d'immunoglobulines sécrétées par les hybridomes a été déterminée en incubant dans un premier temps les surnageants en culture dilués dans le tampons PBS tween avec du fragment D immobilisé pour les anti D, ou du fragment E immobilisé pour les anti E, selon la technique utilisée pour la sélection des lignées sécrétant des anticorps. Toutefois, 5 incubations identiques sont réalisées pour chaque anticorps.

Dans un deuxième temps les immunoglobulines fixées sur l'antigène immobilisé sont révélées par incubation avec 5 antisérums anti Ig de souris différents : anti IgG 1, anti IgG 2a, anti IgG 2b, anti IgN et anti 7S (Laboratoire Nordic, anticorps obtenu chez la chèvre). Les antisérums sont utilisés dilués au 1/500 dans le tampon PBS tween.

Dans un troisième temps, l'Ig de chèvre susceptible d'être fixée à l'Ig de souris est révélée par une nouvelle incubation des plaques avec des Ig anti Ig de chèvre marquées à la peroxydase (réactif Nordic utilisé à une dilution au 1/500 dans le PBS tween), suivie d'une révélation de la peroxydase par la technique précédemment décrite.

CHAPITRE III

RESULTATS

OBTENTION D'HYBRIDOMES PRODUISANT DES ANTICORPS DIRIGES CONTRE

DES DERIVES DE LA FIBRINE

SELECTION DE CERTAINES LIGNEES

Quatre hybridations ont été réalisées.

- Pour la première hybridation, 10 boîtes de culture cellulaire à 96 puits ont été ensemencées avec les hybrides lymphocyte/plasmocyte.
- Pour les trois suivantes, 5 boîtes de culture à 96 puits ont été utilisées par hybridation.

I. CLASSIFICATION ET PREMIERE SELECTION DES HYBRIDES OBTENUS

Pour ces hybridations correspondant à 2400 surnageants testés nous avons trouvé 324 surnageants possédant une réactivité vis-à-vis du fibrinogène ou des produits de dégradation de la fibrine ayant servi à l'immunisation des souris.

En effet, par le test immuno-enzymologique précédemment décrit, les Ig présentes au niveau de ces surnageants se fixaient au fibrinogène ou aux produits de dégradation de la fibrine (pdFb) fixés sur le puits, fixation révélée secondairement par des Ig de chèvre anti Ig de souris marquées à la peroxydase.

Parmi ces 324 hybridomes, 4 d'entre eux ont été sélectionnés immédiatement, car les Ig sécrétés par ces cellules avaient la propriété de réagir avec le fragment D et avec les PDFb, mais ne réagissaient, ni avec le fragment E, ni avec le fibrinogène non dégradé fixé sur le polystyrène. La réactivité de ces anticorps vis-à-vis du domaine D de la molécule de fibrinogène et leur absence de réactivité vis-à-vis de la molécule entière de fibrinogène, nous a conduit à les dénommer anticorps-"anti D néo", selon la dénomination de Edgington et Plow. Ces anticorps anti-D néo ne se fixent pas sur

les monomères de fibrine immobilisées sur la plaque de polytyrène.

Parmi les 319 hybridomes restant, nous en avons sélectionné 62, car le surnageant de leur culture avait une réactivité importante vis-à-vis du fibrinogène et des pdFb (D.O. correspondant à l'activité de la peroxydase, supérieure à 1,5 en 2 mn). Parmi ces 62 hybrides, 15 sécrétaient des anticorps réagissant avec le domaine E de la molécule de fibrinogène, mais non avec le domaine D (anti E) et les 47 autres sécrétaient des anticorps ayant une réactivité vis-à-vis du domaine D et non vis-à-vis du domaine E (anti D complet).

Parmi ces anticorps, les 4 anti D néo, 5 anti E et 9 anti D complets ont été clonés, puis une fois les clones sélectionnés par la même technique que celle qui a servi à analyser les premiers surnageants. Le surnageant des clones ainsi sélectionnés a été soumis à une étude plus approfondie.

II. REACTIVITE DES ANTICORPS SELECTIONNES PUIS CLONES VIS-A-VIS

DE L'ANTIGENE EN SOLUTION. EPREUVE DE DEPLACEMENT

A. DETERMINATION DE LA DILUTION DU SURNAGEANT D'HYBRIDOME A REALISER POUR PRATIQUER UNE EPREUVE DE DEPLACEMENT

Cette détermination est effectuée sur le fibrinogène ou le fragment D immobilisé dans le cas des anti D et sur le fibrinogène ou le fragment E immobilisé dans le cas des anti E.

- Aux fortes concentrations en anticorps (dilutions peu

importantes) il y a une fixation maximale d'anticorps sur la plaque où l'antigène a été fixé, quelle que soit la dilution d'anticorps. Puis, à partir d'une certaine dilution il y a une diminution progressive de la fixation d'Ig. Il existe une relation semi logarithmique entre l'inverse de la dilution effectuée (échelle logarithmique) et la D.O. à 492 nm (échelle arithmétique) représentant l'activité de l'immuno-péroxydase fixée à la plaque. Les pentes des droites ainsi établies en mettant en abscisses l'inverse de la dilution d'anticorps (échelle logarithmique) et en ordonnées la quantité d'anticorps fixés à l'antigène immobilisé, varient d'un anticorps à l'autre (Fig. 20).

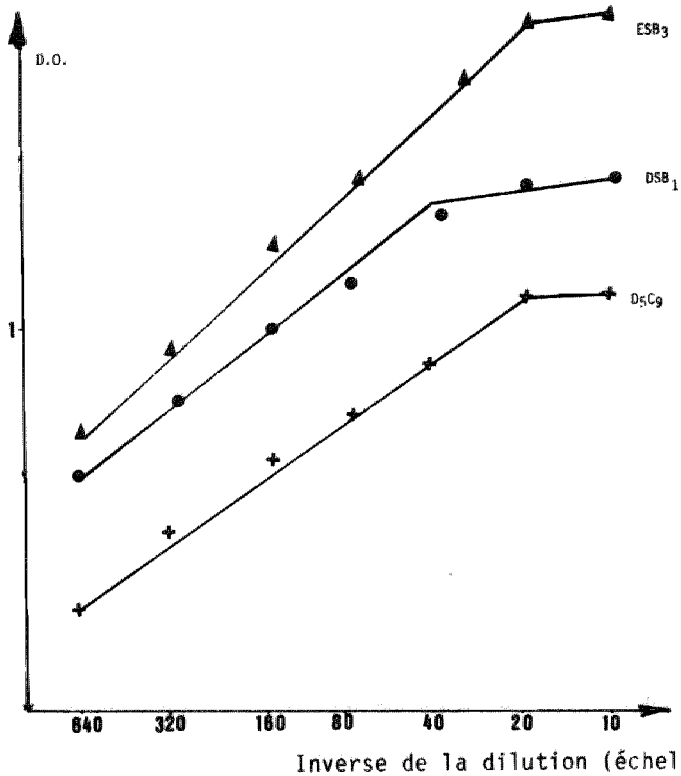
Dans la réaction d'inhibition de la fixation de l'anticorps sur l'antigène immobilisé, la dilution d'anticorps à utiliser est celle pour laquelle la fixation d'immunoglobuline sur l'antigène immobilisé est comprise entre 60 et 80 % de la fixation maximale. En effet, pour que la réaction d'inhibition soit sensible, il ne faut pas se trouver en excès d'anticorps.

B. REACTIVITE DU FIBRINOGENE, DES COMPLEXES DE DEGRADATION DE LA FIBRINE ET DES PRODUITS DE DEGRADATION DU FIBRINOGENE EN SOLUTION, VIS-A-VIS DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La réaction de compétition entre antigène en solution et antigène immobilisé pour se combiner à l'anticorps est pratiquée.

En portant en abscisses la quantité d'antigène en solution (échelle logarithmique) incubé avec l'anticorps et en ordonnées la D.O. (échelle arithmétique) correspondant à la quantité d'anticorps fixé sur l'antigène immobilisé, il peut être déterminé :

Fig. 20: Courbe d'étalonnage de différents anticorps sur du fibrinogène immobilisé.



1) La dose minimale d'antigène en solution qui entraîne l'inhibition totale de la fixation de l'anticorps à l'antigène immobilisé.

2) Les doses d'antigène pour lesquelles il y a une relation linéaire inverse entre la quantité d'antigène en solution incubé avec l'anticorps et la quantité d'anticorps qui se fixe sur l'antigène immobilisé sur la plaque de polystyrène.

La pente de cette droite est variable selon les anticorps. On évalue ainsi la quantité d'antigène qui induit 50 % d'inhibition de la fixation de l'anticorps sur l'antigène immobilisé sur la plaque de polystyrène.

3) La réactivité de l'anticorps vis-à-vis du fibrinogène en solution en comparaison avec celle observée vis-à-vis des pdFb en solution et du fragment D dans le cas des anti D ou du fragment E dans le cas des anti E.

1) Etude des anti-D

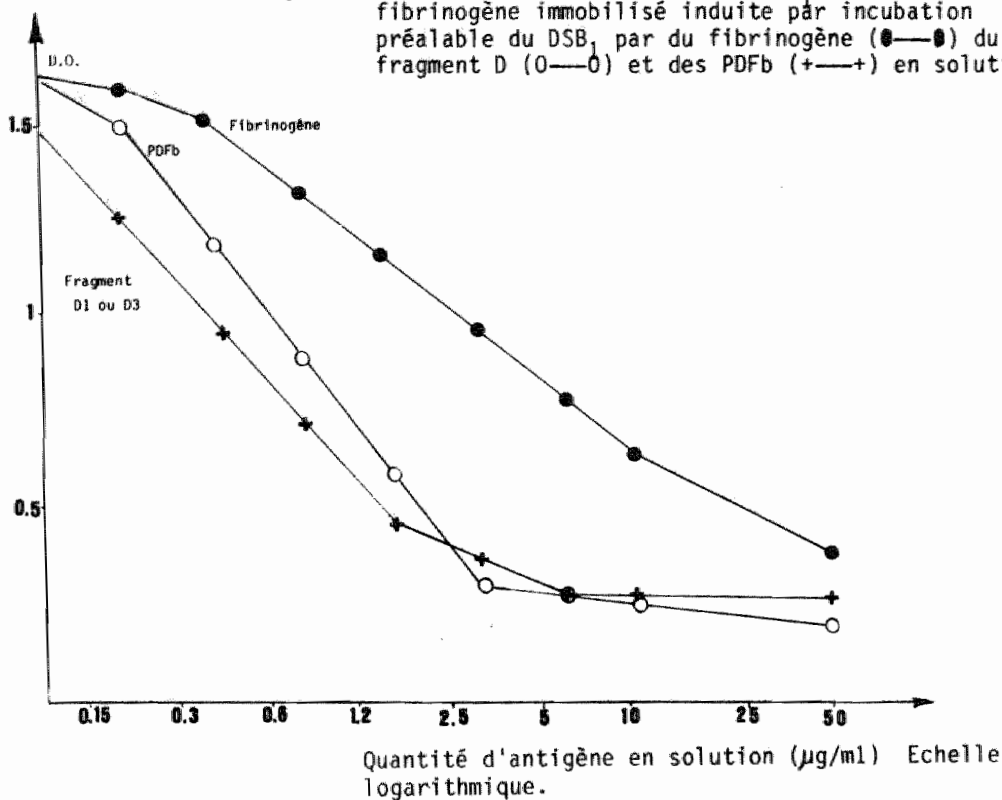
a) Etude des anticorps réagissant avec le fibrinogène et avec le fragment D = anti-D complets.

Neuf surnageants de culture ayant la spécificité d'un anti-D complet ont été analysés.

- Anticorps réagissant aussi bien avec le fibrinogène immobilisé qu'avec le fibrinogène en solution.

Sept surnageants de culture utilisés aux dilutions préalablement déterminées, lorsqu'ils sont incubés en phase liquide avec des concentrations progressivement décroissantes d'antigène, se fixent d'autant moins sur l'antigène immobilisé, qu'il y a plus d'antigène en solution.

Fig. 21: Inhibition de la fixation du DSB₁ sur du fibrinogène immobilisé induite par incubation préalable du DSB₁ par du fibrinogène (●—●) du fragment D (○—○) et des PDFb (+—+) en solution.



Les résultats objectivés dans la figure 21 montrent le type de courbe d'inhibition obtenue selon les antigènes solubles utilisés (fibrinogène, fragment D, PDFb).

Des différences peuvent être objectivées dans la capacité du fibrinogène, du fragment D ou des PDFb pour inhiber la fixation d'un même anticorps monoclonal sur du fibrinogène immobilisé, comme le montre le tableau II.

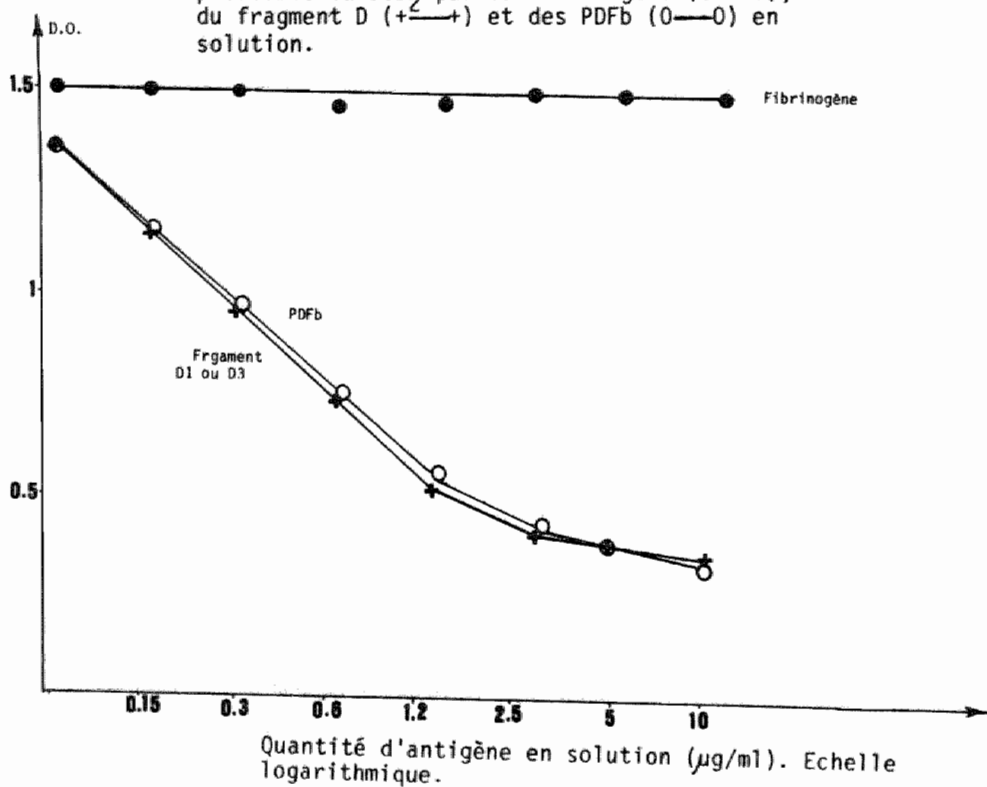
Ce tableau résume les propriétés des différents anticorps vis-à-vis des différents antigènes en solution.

- Anticorps réagissant différemment avec le fibrinogène en solution et le fibrinogène fixé sur le polystyrène.

Deux surnageants de culture de cellules se comportent tout à fait différemment des surnageants du groupe précédent. En effet, lorsqu'ils sont incubés à la dilution préalablement déterminée avec du fragment D ou des PDFb en solution, comme pour les anticorps précédents, il est observé une diminution de la quantité d'anticorps fixé sur l'antigène immobilisé (fibrinogène ou fragment D) d'autant plus importante que la concentration en fragment D ou en PDFb en solution est plus importante.

En revanche lorsque ces deux anticorps utilisés toujours à la même dilution sont incubés avec une solution de fibrinogène (quelle qu'en soit la dose) il n'a pas été observé d'inhibition de fixation d'anticorps, que ce soit sur le fragment D ou sur le fibrinogène immobilisé (fig. 22). Le tableau III résume les caractéristiques de ces deux anti-D reconnaissant le fibrinogène immobilisé et non le fibrinogène en solution.

Fig. 22: Inhibition de la fixation du DSB₂ sur du fibrinogène immobilisé induite par incubation préalable du DSB₂ par du fibrinogène (●—●), du fragment D (+—+) et des PDFb (○—○) en solution.



Quantité d'antigène en solution nécessaire ($\mu\text{g/ml}$) pour induire une inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal sur du Fg immobilisé.									
	Fibrinogène			Fragment D			PDFb		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
	d'inhibition			d'inhibition			d'inhibition		
DSB1	100	4	0,3	6	0,45	0,10	3	0,8	0,1
DSB3	5	1,2	0,1	6	1,4	0,45	6	1,7	0,4
DSB4	>100	-	-	> 50	-	-	> 50	-	-
D5C9	25	1,5	0,18	25	2,0	0,36	6	1,0	0,36
D4A10	10	1,0	0,1	12	1,2	0,18	12	1,2	0,36
B4	12	1,5	0,36	25	6,0	0,36	25	6,0	0,36
D5C9	6	1,0	0,36	6	1,0	0,36	1,5	0,4	0,36

Tableau II. Caractéristiques des principaux anti-D complets sélectionnés.

Tableau III : Caractéristiques des deux anti-D reconnaissant le fibrinogène immobilisé et non le fibrinogène en solution .

Quantité d'antigène en solution nécessaire ($\mu\text{g/ml}$) pour induire une inhibition de la fixation d'anticorps monoclonal sur du fibrinogène immobilisé.									
Fibrinogène			Fragment D1			PDFb			
100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	
d'inhibition			d'inhibition			d'inhibition			
DSB2	-	-	> 50	2,5	0,300	0,038	2,5	0,300	0,04
D5H4	-	-	> 100	25	10	1,5	25	3	0,4

Ces anticorps ont donc la particularité de reconnaître le fibrinogène quand il est fixé sur un support solide et de ne pas réagir avec le fibrinogène en solution.

b) Etude des anticorps anti-D néo

Quatre surnageants de culture dont la particularité lors de la sélection des lignées était de se fixer sur les PDFb stabilisés ou le fragment D immobilisé, mais non sur le fibrinogène, ont été également analysés. Lorsque ces 4 surnageants dilués à la dilution préalablement déterminée, sont incubés avec des concentrations progressivement décroissantes d'antigène (fibrinogène, fragment D ou PDFb) il est observé que :

- la diminution de la fixation d'anticorps sur le fragment D

immobilisé est d'autant plus importante que l'anticorps est incubé avec des quantités plus grandes de fragment D ou de PDFb en phase liquide.

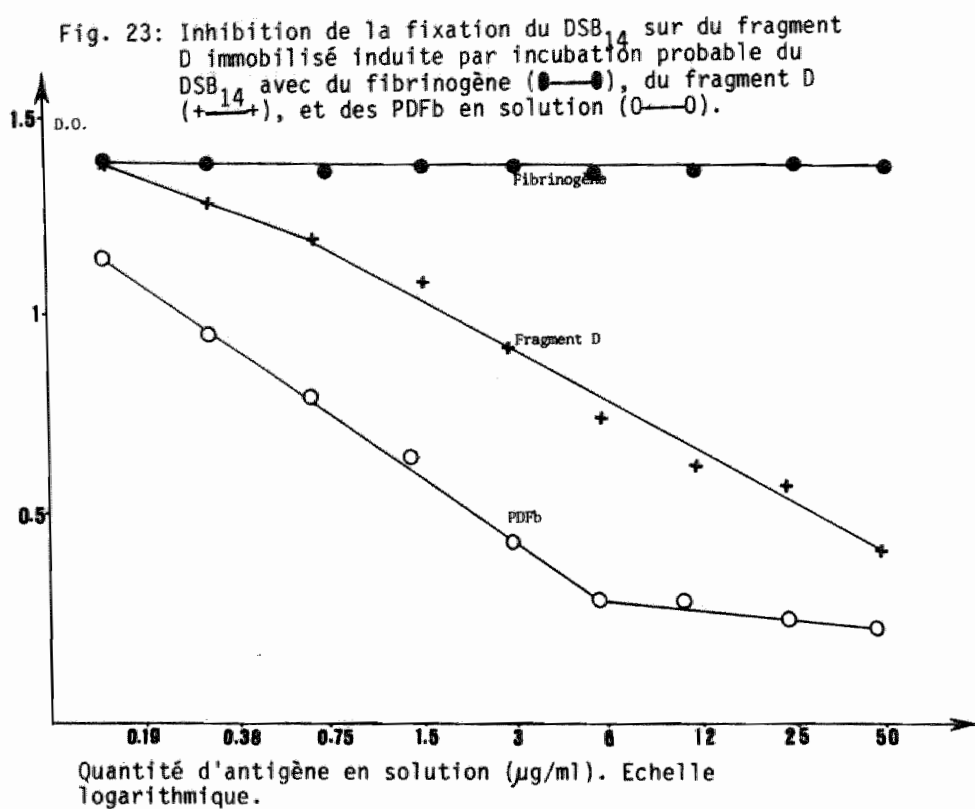
- aucune diminution de fixation d'anticorps sur le fragment D immobilisé n'apparaît en revanche lorsque l'anticorps est incubé avec des doses même importantes de fibrinogène en solution. Le tableau IV résume les propriétés de ces anti-D néo anticorps.

Tableau IV : Caractéristiques de ces anti-D néo anticorps

Quantité d'antigène en solution nécessaire ($\mu\text{g/ml}$) pour induire une inhibition de la fixation d'anticorps monoclonal sur du fragment D immobilisé.						
	Fragment D			PDFb		
	100 %	50 %	0%	100 %	50 %	0 %
	d'inhibition			d'inhibition		
DSB14	50	6	0,19	6	0,70	0,090
DSB11	10	10	0,018	10	10	0,019
DSB13	1,2	0,10	0,018	1,2	0,300	0,018

L'anticorps DSB14 est particulièrement intéressant, car comme il apparaît dans ce tableau IV et dans la figure 23. Cet anticorps est beaucoup plus déplacé par les PDFb que par le fragment D isolé.

c) Etude comparée de la réactivité des anti-D vis-à-vis du fragment D1 et du fragment D3.



Parmi les anticorps anti-D complets, 2 se sont révélés particulièrement intéressants, car il a pu être montré par des épreuves de compétition que ces deux anticorps réagissaient avec le fragment D1 immobilisé ou en solution, mais pas avec le fragment D3. Il s'agit de l'anticorps B4 et D4A10 qui réagissent bien avec le fragment D1 en solution, puisque le fragment D1 incubé avec l'anticorps est capable d'inhiber la fixation de cet anticorps sur du fibrinogène immobilisé (Tableau II). En revanche le fragment D3, à la concentration de 100 gamma/ml n'est pas capable d'inhiber la fixation de ces anticorps sur le fibrinogène fixé sur le polystyrène.

2) Etude des anti-E

Parmi les 15 surnageants de culture ayant la spécificité anti-E qui ont été sélectionnés et clonés, 5 d'entre eux ont été analysés en détail.

Les anticorps monoclonaux anti-E obtenus, ont été dénommés anti-E complets, car ils réagissent avec le fibrinogène et le fragment E. Les résultats sont objectivés dans la figure 24 et dans le tableau V. Ils montrent les relations existant entre le degré d'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal sur du fragment E immobilisé et la quantité de fibrinogène, fragment E ou PDFb en phase liquide incubés avec l'anticorps.

Tableau V : Caractéristique des principaux anti-E obtenus.

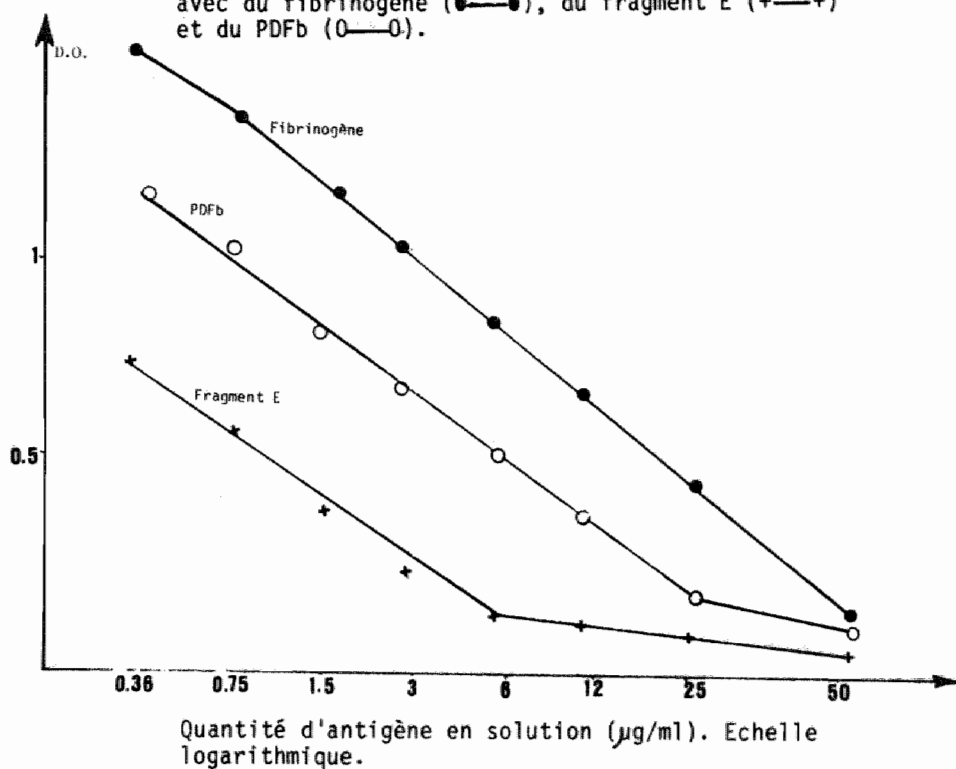
Quantité d'antigène en solution nécessaire ($\mu\text{g/ml}$) pour induire une inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal sur du fragment E immobilisé.									
	Fibrinogène			Fragment E			PDFb		
	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %	100 %	50 %	0 %
	d'inhibition			d'inhibition			d'inhibition		
ESB1	100	10	0,10	100	20	0,20	-	-	50
ESB2	500	100	5	60	5	0,75	200	50	1,5
ESB3	40	3,25	0,10	3	0,30	0,02	12	1,5	0,10
E3F8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	5	0,02
E1G6	100	100	25	100	100	12	100	100	10

L'anticorps ESB1 a la particularité de ne pas réagir avec le PDFb, alors qu'il réagit avec le fibrinogène et le fragment E.

III. REACTIVITE DES DIFFERENTS ANTICORPS VIS-A-VIS DES CHAINES DISSOCIEES DU FIBRINOGENE

La réactivité de certains anticorps sélectionnés a été étudiée vis-à-vis de la chaîne A alpha, de la chaîne B beta et de la chaîne gamma préalablement fixées sur le polystyrène. Pour la majorité des anticorps, aucune réactivité vis-à-vis des chaînes dissociées n'a été mise en évidence puisque ces anticorps étaient incapables de se fixer

Fig. 24: Inhibition de la fixation du ESB3 sur du fragment E immobilisé induite par incubation préalable de ESB3 avec du fibrinogène (●—●), du fragment E (+—+) et du PDFb (○—○).



sur les chaînes immobilisées sur le support solide. Toutefois, il a été trouvé que l'anticorps DSB1 (anti-D complet) réagissait avec la chaîne gamma isolée et que l'anticorps DSB12 (anti-D néo anticorps) réagissait avec la chaîne B beta.

IV. REACTIVITE DES DIFFERENTS ANTICORPS VIS-A-VIS DES AUTRES PROTEINES PLASMATIQUES

L'incubation 18 heures à 4°C des anticorps sélectionnés avec un volume égal de plasma de malade atteint d'afibrinogénémie (la dilution finale d'anticorps étant celle choisie pour les épreuves de déplacement), n'entraîne pas d'inhibition de la fixation des anticorps sur le fragment D ou le fragment E immobilisé. Cette constatation nous permet d'affirmer que ces anticorps ne réagissent pas avec des protéines plasmatiques, autres que le fibrinogène.

V. DETERMINATION DE LA CLASSE D'Ig DES ANTICORPS SELECTIONNES

Curieusement, tous les anticorps sélectionnés appartiennent à la classe d'IgG1, puisque ces anticorps fixés à l'antigène immobilisé sont uniquement capables de fixer l'anti-IgG1 de souris préparé chez la chèvre, révélé ultérieurement par Ig des anti-Ig de chèvre marquées à la peroxydase. En revanche, dans les mêmes conditions, ces anticorps ne fixent ni les anti-IgG2a, ni les anti-IgG2b, ni les anti-IgM. Par contre, il peuvent se combiner à l'anti-Ig 7S de souris.

CHAPITRE IV

DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS SUR LES

ANTICORPS MONOCLONAUX SELECTIONNES




Les hybridations que nous avons effectuées ont conduit à l'obtention de différents anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de dérivés de la fibrine. Les hybrides sélectionnés puis clonés que nous avons retenus semblent avoir des propriétés différentes quant à leur réactivité vis-à-vis des différentes protéines susceptibles de réagir avec eux, comme le montre le tableau récapitulatif et compte tenu de leur affinité vis-à-vis des différents antigènes (Tableau VI).

En particulier, des anticorps dirigés contre des épitopes accessibles dans la molécule dégradée mais masqués dans la molécule intacte de fibrinogène ont été sélectionnés. Il s'agit des D néo anticorps et des E néo anticorps. Le fait que nos anticorps ne réagissent pas avec d'autres protéines plasmatiques (comme il a été montré par l'absence de consommation des différents anticorps lors de leur incubation avec le plasma d'afibrinogénémie) nous autorise à utiliser ces différents anticorps pour doser les antigènes dérivés du fibrinogène ou de la fibrine dans des plasmas.

I. ANTICORPS REAGISSANT SUR LE FIBRINOGENE ET LE FRAGMENT D OU LE FRAGMENT E

Lorsque l'anticorps réagit sur un épitope à la fois accessible sur le fibrinogène et sur un de ses produits de dégradation (anti-D ou anti-E) la réactivité de l'anticorps vis-à-vis du fibrinogène peut être différente de celle observée vis-à-vis du fragment de dégradation.

324 HYBRIDOMES			
<u>1 ère investigation</u>			
Réactivité avec l'antigène immobilisé	<u>15 Anti E</u>	<u>319 Anti D</u>	
		52 anticorps sélectionnés	
		4 anti D néo 47 anti D complets	
Fibrinogène	+++	-	+++
Fragment D	-	+++	+++
Fragment E	+++	-	-

<u>2 ème investigation</u>	5 clonages	4 clonages	9 clonages
Inhibition de la fixation de l'anticorps sur l'antigène immobilisé par des solutions de :			
	Anti E 4	Anti E 1	Anti D néo 3
			Anti D néo 1
			Anti D Total 5
			Anti D 2
			Anti D 1 conf 2
Fibrinogène	+++	+++	-
Fragment E	+++	+++	-
PDFb	+++	-	+++
Fragment D ₁	-	-	+++
Fragment D ₃	-	-	+++

* Conf : de conformation

Tableau VI : Classification des hybridomes obtenus. Récapitulation des résultats.

Cependant, pour interpréter les différences de réactivité de l'anticorps pour le fibrinogène d'une part, et pour le fragment de dégradation d'autre part, il faut tenir compte des poids moléculaires respectifs du fibrinogène, du fragment D et du fragment E (respectivement 340.000, 105.000 et 55.000) et du fait qu'une molécule de fibrinogène renferme deux fragment D et un seul fragment E.

Ainsi, il est établi que 100 gammas de fibrinogène correspondent approximativement à 60 gammas d'équivalent D1 et seulement à 15 gammas d'équivalent E. Une correspondance entre fragments de dégradation du fibrinogène et complexes de dégradation de la fibrine, est beaucoup plus difficile à établir compte tenu de la grande variété existant dans les complexes de dégradation de la fibrine. Quand elle est calculée, elle est effectuée sur la base d'un complexe de dégradation D-D-E.

A. ANTICORPS REAGISSANT AVEC LE FIBRINOGENE ET LE FRAGMENT D EN TENANT COMPTE DES CALCULS D'EQUIVALENCE

L'anticorps DSB1 par exemple réagit beaucoup plus avec le fragment D ou les PDFb, qu'avec le fibrinogène : il faut 6 gammas/ml de fragment D et de PDFb pour induire une inhibition complète de la fixation de cet anticorps (à la dilution choisie) sur du fibrinogène immobilisé, tandis qu'il faut 100 gammas/ml de fibrinogène, correspondant à 60 gammas/ml d'équivalent D pour obtenir la même inhibition, dans les mêmes conditions.

De même, pour induire 50 % d'inhibition de la fixation de

l'anticorps sur l'antigène immobilisé, il faut incuber l'anticorps, soit avec 0,45 $\mu\text{g/ml}$ de fragment D, soit avec 4 $\mu\text{g/ml}$ de fibrinogène, correspondant à 2,4 μg /ml d'équivalent D.

La différence de réactivité peut être facilement expliquée par le fait que l'épitope réagissant avec cet anticorps doit être beaucoup plus exposé dans les produits de dégradation que dans la molécule native de fibrinogène.

Parmi les anticorps anti-D, deux anticorps sont particulièrement intéressants car ils réagissent avec le fragment D1 (D cate) et non avec le fragment D3 (DEGTA). Il s'agit des anticorps B4 et D4A10. Or il est connu que le fragment D3 est plus dégradé que le fragment D1, le fragment D1 possédant un peptide supplémentaire à l'extrémité C terminal de la chaîne gamma, correspondant au peptide compris entre le résidu gamma 303 et le résidu gamma 411, de la chaîne gamma du fibrinogène (86). De tels anticorps doivent donc réagir avec un épitope présent sur la portion de chaîne gamma 303-gamma 411.

Toutefois, ces deux anticorps ne réagissent pas avec la chaîne gamma, isolée du fibrinogène, soit que l'épitope soit masqué dans cette chaîne gamma isolée du fait de sa configuration tertiaire, soit que la fixation de la chaîne gamma au polystyrène se fasse au niveau des épitopes spécifiques de ces anticorps. Cette portion de chaîne gamma 303-411 a un rôle physiologique important dans la fonction du fibrinogène. En effet, c'est à ce niveau que sont localisés les sites de polymérisation aux monomères de fibrine, ainsi que le site permettant au fibrinogène de se lier aux plaquettes.

B. ANTICORPS REAGISSANT AVEC LE FIBRINOGENE ET LE FRAGMENT E

Concernant les anti-E, des différences de réactivité de l'anticorps vis-à-vis du fibrinogène, du fragment E et des PDFb sont également observées avec certains anticorps et pas avec d'autres.

Ainsi, d'après les résultats exposés au tableau V, en calculant en équivalent E, l'anticorps ESB2 réagit approximativement de la même manière avec le fibrinogène qu'avec le fragment E, compte tenu que 500 gammas de fibrinogène correspondent à 75 gammas d'équivalent E. De même ESB3 réagit approximativement de la même façon avec la molécule intacte et avec le fragment E.

Concernant la réactivité de ces deux anticorps vis-à-vis des produits de dégradation de la fibrine, le calcul a été effectué en équivalent E par sous unité D-D-E. Là encore, ces deux anticorps semblent avoir approximativement la même réactivité pour le fragment E que pour les PDFb, puisque par exemple, pour l'anticorps ESB2, 200 gammas de PDFb correspondant à 45 gammas d'équivalent E, sont nécessaires pour induire 100 % d'inhibition de la fixation de l'anticorps sur l'antigène immobilisé.

Au contraire, quand on calcule en équivalent E, l'anticorps E1G6 réagit mieux avec le fibrinogène, un peu moins avec les PDFb et assez mal avec le fragment E. Cette mauvaise réactivité de E2G6 vis-à-vis du fragment E est expliquée par le fait que la conformation tertiaire du fragment E est telle que l'épitope qui était accessible sur le fibrinogène ou les produits de dégradation de la fibrine, l'est moins sur le fragment E isolé et purifié.

L'anticorps ESB1 est particulièrement intéressant, car bien qu'il réagisse avec le fibrinogène et à un moindre degré avec le fragment E, il présente la particularité de ne pas réagir avec les PDFb (qu'il s'agisse des PDFb précoces, ou des complexes D-D-E). L'épitope révélé par cet anticorps au niveau du fragment E est donc vraisemblablement masqué par le dimère D-D présent dans les produits de dégradation de la fibrine. Un tel anticorps peut être précieux pour différencier les produits de dégradation du fibrinogène, des produits de dégradation de la fibrine. Cet anticorps provient vraisemblablement de l'immunisation des souris par les traces de fragment E libre qui contaminaient la préparation de PDFb ayant servi à l'immunisation.

II. ANTICORPS NE REAGISSANT PAS AVEC LE FIBRINOGENE INTACT MAIS

REAGISSANT AVEC LE FRAGMENT D

Deux types d'anticorps ont été sélectionnés :

A. ANTI-D NEO ANTICORPS

Il a été appelé anti-D néo anticorps, des anticorps qui ne réagissaient pas avec le fibrinogène (en solution, ou immobilisé) mais possédaient une réactivité vis-à-vis du fragment D (fragment D isolé ou inclus dans les complexes de dégradation de la fibrine). L'épitope révélé par ces anticorps est donc masqué dans la molécule de fibrinogène non dégradé.

Les D-néo antigènes apparaissant après clivage de la molécule ont été localisés par Plow et Edgington (160) dans la portion centrale de la chaîne gamma (gamma 95-gamma 264). Cinq épitopes différents ont pu être identifiés par Fair (50). Tous ces épitopes, bien que présents dans la molécule de fibrinogène, sont peu accessibles à l'anticorps dans le fibrinogène intact. Ils correspondent aux fragments gamma 95-108, gamma 109-194, gamma 198-247, gamma 248-256 et gamma 257-264.

Il est difficile à l'heure actuelle de savoir si les D-néo antigènes (gamma 160-197) décrits par Plow et al. 166, correspondent à un des cinq épitopes de Fair.

Parmi les D-néo anticorps sélectionnés ici, aucun ne réagissait avec la chaîne gamma isolée et intacte, par contre l'un d'entre eux, le DSB12 se fixait sur la chaîne B beta immobilisée permettant ainsi d'affirmer pour la première fois qu'un D-néo antigène était localisé au niveau de la chaîne beta. L'utilisation d'un tel anticorps est précieuse pour l'étude de la structure conformationnelle du fibrinogène.

Le manque de réactivité des autres D-néo anticorps vis-à-vis des chaînes dissociées du fibrinogène et en particulier vis-à-vis de la chaîne gamma, particulièrement riche en néo-antigènes, peut être expliqué,

- soit par la structure tertiaire de la chaîne isolée entraînant un masquage de l'épitope normalement accessible sur le fragment D.
- soit par le fait que l'épitope présent au niveau de la chaîne, soit enfoui dans le polystyrène lors de la fixation de la chaîne sur la plaque, la rendant de ce fait inaccessible à l'anticorps.

L'un de ces anti-D néo, DSB14, possède la propriété de réagir beaucoup plus avec les PDFb qu'avec le fragment D. En évaluant la quantité de PDFb en équivalent D (calcul effectué par sous unité D-D-E) dix fois plus de fragment D en solution sont nécessaires pour inhiber complètement la fixation de l'anticorps à du fragment D immobilisé que de complexe D-D-E. Cet anticorps possède les mêmes types de réactivité que l'hétéro-antisérum de Budzinski et al. (26). L'utilisation simultanée de cet anticorps DSB14 et d'un autre D-néo anticorps ayant la même réactivité pour le fragment D et pour les PDFb, permet de différencier dans un échantillon les produits de dégradation du fibrinogène de ceux de la fibrine.

Par exemple, compte tenu des résultats exposés au tableau IV, si dans un échantillon donné A,

- la dilution nécessaire de cet échantillon A pour obtenir 100 % d'inhibition de la fixation du DSB14 sur du fragment D immobilisé est de 1/10, ceci veut dire que l'échantillon renferme $10 \times 25 \mu\text{g/ml}$ de fragment D ou $10 \times 3 \mu\text{g/ml}$ de PDFb ;

- la dilution nécessaire de cet échantillon pour obtenir 100 % d'inhibition de la fixation d'un autre anti-D néo anticorps le DSB13 sur le fragment D immobilisé est de 1/25, cela correspond à $1,2 \times 25 \mu\text{g/ml}$ de fragment D ou de PDFb, la sensibilité de cet anticorps était en effet, la même pour le fragment D que pour les PDFb ;

- la confrontation des résultats obtenus avec ces deux anticorps permet de conclure que dans ce cas, l'échantillon A renferme principalement des PDFb.

Si dans un deuxième échantillon B :

- la dilution nécessaire de cet échantillon B pour induire 100 %

d'inhibition de la fixation de DSB14 sur du fragment D immobilisé est toujours de 1/10,

- mais que la dilution nécessaire de l'échantillon pour induire 100 % d'inhibition de la fixation de DSB13 sur du fragment D immobilisé soit de 1/250, cela veut dire que l'échantillon renferme $1,2 \times 250 = 300$ µg/ml de PDFb ou de fragment D,

- la confrontation des résultats obtenus avec ces deux anticorps permet alors de conclure que l'échantillon B renferme principalement du fragment D.

Cette technique d'investigation utilisant les deux anticorps doit être réservée à des cas très précis. En effet, en pratique courante, le fibrinogène n'est pas dégradé par la plasmine dans la circulation, car d'une part, l'activation du plasminogène en plasmine par l'activateur tissulaire (tpA) nécessite de la fibrine et d'autre part, la plasmine susceptible d'être formée est neutralisée instantanément par l'alpha2 antiplasmine présente en grande quantité dans le sang circulant. En revanche, lorsqu'il y a des thrombi, l'activation du plasminogène en plasmine par le tpA est potentialisé par la fibrine et de plus, la fibrine fixant très peu d'antiplasmine est facilement dégradée par la plasmine ainsi formée. Ceci explique qu'en pathologie les produits de dégradation du fibrinogène ne sont retrouvés qu'exceptionnellement et qu'en revanche les produits de dégradation de la fibrine stabilisée constituent souvent un des critères essentiels de diagnostic de CIVD.

B. ANTICORPS ANTI-D REAGISSANT AVEC LE FIBRINOGENE IMMOBILISE
SUR UN SUPPORT ET NE REAGISSANT PAS AVEC LE FIBRINOGENE EN
SOLUTION

Les anticorps DSB2 et D5H4 possèdent la propriété de se fixer aux plaques de fibrinogène immobilisé. En revanche, le fibrinogène en solution, même à des concentrations importantes (supérieur à 50 gamma/ml) est incapable d'induire une inhibition de la fixation de ces deux anticorps sur du fibrinogène ou du fragment D immobilisé. Ces anticorps révèlent donc un épitope accessible sur le fragment D (immobilisé ou en solution), et sur le fibrinogène immobilisé, mais non accessible sur le fibrinogène en solution. Ces deux anticorps permettent donc de détecter un changement conformationnel du fibrinogène lors de son adsorption sur une surface, puisque le fibrinogène immobilisé contrairement au fibrinogène en solution est capable de fixer ces deux anticorps.

De tels anticorps peuvent avoir une importance pratique considérable pour l'étude des bio-matériaux utilisés pour les greffes ou les circulations extra-corporelles.

En effet, l'adsorption des protéines du sang sur les bio-matériaux est la première étape d'une suite de réactions qui peuvent conduire, soit à la bio-compatibilité du matériau, soit au contraire à l'apparition de thromboses.

Le rôle de la composition des protéines fixées à la surface du bio-matériau d'une part et de leur conformation d'autre part dans l'interaction du matériau avec le sang circulant, reste toujours controversé. Le cas du fibrinogène a été très étudié, puisqu'il est

connu que le fibrinogène s'adsorbe sélectivement sur des matériaux artificiels et que les plaquettes adhèrent secondairement au matériel recouvert de fibrinogène.

De nombreuses études biophysiques ont été faites concernant les changements de conformation du fibrinogène induites par son adsorption à une surface, mais conduisent souvent à des résultats contradictoires. En général, les techniques utilisées pour étudier les changements conformationnels des protéines induites par leur absorption à une surface, requièrent un équipement spécial lourd et utilisent en général des propriétés optiques telles que les mesures d'adsorption de certains rayonnements infra-rouges sur des surfaces de silice, des spectres infra-rouges, des spectres Raman ou du dichroïsme circulaire sur des disques en quartz. Cette dernière technique peut être utilisée pour étudier les changements conformationnels du fibrinogène adsorbé puis élué et peut donc être utilisée quel que soit le matériau. Cependant, les résultats de cette technique après élution peuvent être différents de ceux obtenus par la technique directe (sans élution) utilisant des disques de quartz.

D'autres méthodes utilisent des techniques telle que la microcalorimétrie.

L'avantage de la méthode proposée avec les anticorps monoclonaux est d'être aisément réalisable. De plus elle peut être pratiquée quel que soit le matériel à tester et est indépendante de la surface et des propriétés optiques du bio-matériel.

Enfin, les résultats mettent directement en évidence le changement conformationnel du fibrinogène.

La technique proposée ici a en outre l'avantage de pouvoir être appliquée à d'autres protéines.

III. COMPARAISON DES ANTICORPS MONOCLONAUX OBTENUS AVEC LES AUTRES ANTICORPS DECRITS DANS LA LITTERATURE

Compte tenu de la complexité de la molécule de fibrinogène, de nombreux chercheurs ont préparé des anticorps destinés, d'une part à établir la cartographie de la molécule de fibrinogène, d'autre part à identifier et quantifier les produits issus de la dégradation par la plasmine du fibrinogène ou de la fibrine, ou résultant de l'attaque du fibrinogène par la thrombine.

Durant ces dix dernières années des études immunologiques ont été développées dans ce but. Certaines ont été réalisées à l'aide d'antisérums préparés par les méthodes conventionnelles d'immunisation, puis adsorbés secondairement sur des produits dérivés de l'agent immunogène utilisé, afin de rendre l'antisérum spécifique d'un domaine particulier de la molécule. C'est ainsi que Plow et Edgington (155, 158) ont préparé des anticorps contre des néo-antigènes apparaissant lors de la dégradation du fibrinogène, en immunisant des animaux avec le fragment D ou le fragment E, puis en adsorbant les antisérums obtenus sur du fibrinogène. Cependant, les anticorps ainsi obtenus ont un titre très faible.

D'autres travaux ont été réalisés à l'aide d'antisérums préparés par immunisation d'animaux avec des petits fragments de dégradation du fibrinogène, préalablement isolés ou synthétisés, afin d'obtenir des anticorps spécifiques d'un domaine donné de la molécule.

Ainsi, des dosages radio-immunologiques du FpA et du FpB ont été réalisés par Nossel et al. (10, 141) pour l'investigation biologique des états d'hypercoagulabilité. Le dosage du FpA est devenu maintenant un examen d'investigation biologique courante et un dosage immuno-enzymologique a été mis au point.

Puis ont été réalisés, le dosage du peptide B beta 1-42 et du peptide B beta 15-42, qui sont respectivement témoins de la thrombolyse de la fibrine I et de la fibrine II (108, 145, 146). En effet, comme il a été vu dans le premier chapitre, l'attaque du fibrinogène par la thrombine se fait en deux étapes. La première étape est liée au départ du fpA et conduit à la fibrine I, la deuxième étape étant liée au départ du fpB et aboutissant à la formation de la fibrine II, d'une structure plus compacte que la fibrine I.

L'antisérum préparé par immunisation avec le peptide B beta 1-42 réagit en outre avec le fibrinogène, avec le fpB (B beta 1-14) et avec le peptide B beta 15-42.

L'antisérum préparé par immunisation avec le peptide B beta 15-42 réagit également avec le B beta 1-42 et avec le fibrinogène (108). Pour différencier fpB, peptide B beta 1-42 et B beta 15-42, outre la détermination de l'antigénicité de l'échantillon vis-à-vis des trois anticorps correspondants à ces trois peptides, Nossel a utilisé la différence d'antigénicité entre le fpB libre et le fpB présent au niveau du peptide B beta 1-42. La réactivité du fpB vis-à-vis de l'antisérum anti fpB est en effet dix fois plus importante avec le fpB libre, qu'avec le fpB inclus dans le peptide B beta 1-42. Il étudie donc l'augmentation de l'antigénicité du fpB liée à l'action de la thrombine (145). Toutefois, tous ces anticorps réagissant également avec le fibrinogène, il est nécessaire pour

évaluer la concentration plasmatique dans ces différents fragments, d'éliminer au préalable le fibrinogène par la bentonite ou par traitement par l'alcool à 50 %.

Enfin, Gollwitzer et al. ont mis au point un dosage radio-immunologique du FCB3, fragment de dégradation du fibrinogène par le bromure de cyanogène. En effet, ce peptide correspondant au peptide alpha 241-476 est très voisin du peptide situé à la moitié C terminal de la chaîne alpha, libéré très précocement lors de l'attaque du fibrinogène par la plasmine. Le dosage du FCB3 dans le sérum permet donc la détection de fragments très précoces de la fibrinolyse, car il est complémentaire du fragment X précoce, encore coagulable par la thrombine et de ce fait non retrouvé dans le sérum.

De plus, pour tous ces antisérums préparés par des méthodes conventionnelles, des différences d'immuno-réactivité peuvent être observées d'une immunisation à l'autre, en particulier vis-à-vis du FpA et du FpB (92, 143) comme il a été vu au chapitre I.

Les études récentes basées sur la production d'anticorps monoclonaux permettent de caractériser des fragments du fibrinogène ou de la fibrine ou de mettre en évidence des modifications conformationnelles de la molécule, comme le montre le tableau récapitulatif des anticorps monoclonaux publiés à notre connaissance jusqu'à ce jour (tableau VII).

Tableau VII: Comparaison des anticorps monoclonaux obtenus avec les autres anticorps décrits dans la littérature.

SOBEL et al. (167):

A I. Fragments obtenus par digestion par le BrCN de la chaîne de la fibrine et renfermant les peptides 241-476 et 518-584.

Type 1) Anticorps réagissant avec des épitope présents sur les fragments de chaîne isolés.
2) Anticorps réagissant avec des déterminants conformationnels de la chaîne polymérisée et ayant peu de réactivité vis à vis des peptides constitutionnels.

Mode ?

In. Détection de déterminants spécifiques de la fibrine stabilisée. Détection précoce des thromboses ?

WILNER et al. (189):

A I. Fibrinogène.

Type 2 anticorps réagissant avec le fibrinogène et le fragment D1, mais ne réagissant ni avec le fragment D-D ni avec le fragment D3. Ils révèlent donc un épitope localisé à l'extrémité C terminal de la chaîne, masqué dans D-D.

Mode - R.I.A.
- Inhibition de la fixation d'anticorps.

In. Différenciation entre produits de dégradation de la fibrine et produits de dégradation du fibrinogène.

KUDRIJK et al. (109):

A I. N-DSK; A 1-51, B 1-118, 1-78.

Type 1 anticorps réagissant avec le fibrinogène le NDSK, le B 1-118, et le des A-NDSK, mais ne réagissant ni avec le des A-des B monomère, ni avec le des A des B NDSK, ni avec le B 15-42. Il détecte donc un épitope localisé au voisinage de la liaison B Arg 14- Gly 15.

Mode - id à WILNER.

In. Investigation de la fibrino(géno)lyse après séparation des peptides par HPLC. Confrontation des résultats obtenus avec ceux du fpA et du B 15-42.

KWAN et al (110):

A I. Heptapeptide synthétique analogue au peptide N terminal de la chaîne B (après élimination du fpB).

Type Anticorps réagissant avec la fibrine, mais ne réagissant pas avec le fibrinogène.

Mode Détection des anticorps fixés sur des monomères immobilisés.

In. Détection de dépôts de fibrine (ex vivo). La détection du peptide B 1-42 n'a pas été effectuée.

RYLATT et al. (161):

A I. D Dimère

Type 2 types d'anticorps: 1) anti D complets, réagissant avec le fibrinogène, le fragment D et le D-D.
2) anti D-D, réagissant avec le D-D et les PDFb, mais ne réagissant pas ou très peu avec le fragment D ou le fibrinogène.

Mode Elisa.

In. Détection des PDFb dans le plasma, par le test cap-tag test: fixation anti DD monoclonal sur un support captant l'antigène, qui sera révélé secondairement par un anti D complet monoclonal marqué à la peroxydase. Permet la détection des PDFb dans le plasma.

BOUCHEIX et al(23); SORIA et al(172); SORIA et al(173);MIRSHAHI et al (132):

A I. Complexes de dégradation de la fibrine.

Type 1) anti D complets.
2) anti D de conformation réagissant avec le fibrinogène immobilisé mais non avec le fibrinogène en solution, réagissant avec le fragment D en solution ou immobilisé.
3) Anti E complets. L'un d'entre eux ne réagit pas avec les PDFb.
4) Anti D néo 1 des anti D néo est plus réactif avec les PDFb qu'avec le fragment D.

Mode Immuno-enzymologie.

In. 1) Anti D conformationnels. Détection de modification de structure du fibrinogène lors de son immobilisation en vue de tester les biomatériaux.
2) Anti D néo.-utilisés pour doser les PDFb dans le plasma -utilisés pour la mise au point d'une technique quantitative d'évaluation de la polymérisation des monomères.
3) Anti D reconnaissant le fragment D1 et non le fragment D3.

A I = Agent Immunogène. Type= Type d'anticorps sélectionné.

Mode= Mode de détection. In= Intérêt.

CHAPITRE V

APPLICATIONS DES ANTICORPS MONOCLONAUX SELECTIONNES

ETUDE ANALYTIQUE DE L'INTERACTION ENTRE LES DIFFERENTS MONOMERES PAR
UTILISATION D'ANTI D-NEO ANTICORPS. APPLICATION A L'ETUDE DES
TROUBLES DE L'AGREGATION DES MONOMERES.

Mise en évidence d'une anomalie du site de polymérisation "a"
de la chaîne gamma dans une dyfibrinogénémie homozygote.

Jusqu'à présent, l'agrégation des monomères de fibrine était étudiée par mesure cinétique de la variation de densité optique, traduisant l'opacification du milieu lors de la formation du caillot de fibrine. Cette étude était effectuée à partir de monomères purifiés de fibrine en solution dans l'acide acétique à 1 %, lesquels après dilution importante dans un tampon approprié (permettant aux forces attractives de se constituer) agrègent ce qui est objectivé par une augmentation de D₀ à 350 nm (7). Toutefois, la technique proposée présente l'inconvénient de ne pas différencier entre anomalie quantitative d'agrégation des monomères avec diminution de formation de caillot et anomalie qualitative liée à la formation d'un caillot translucide de structure anormale.

Dans les dysfibrinogénémies acquises par exemple, un caillot est formé, mais il est translucide (126, 168, 171). Dans ces cas, l'agrégation des monomères par mesure de la variation de D₀ à 350 nm ne se traduisant pas par une augmentation de la densité optique, il est difficile de faire la part entre anomalie qualitative d'agrégation des monomères et diminution d'agrégation.

Pour tenter de mieux analyser le stade d'agrégation des monomères, il a été utilisé la propriété du fragment D1 à s'associer aux monomères de fibrine par formation de liaisons entre les sites "A" et "B" démasqués dans les monomères et leurs sites complémentaires respectivement "a" et "b" présents dans le fragment D1. En effet, ainsi à des doses bien déterminées, le fragment D1 qui possède les sites a et b en se liant aux monomères de fibrine au niveau des sites A et B empêche de ce fait l'interaction des monomères entre eux, du fait du blocage des sites A et des sites B par les sites a et b présents sur le fragment D1, ce qui se traduit par une inhibition de l'agrégation des monomères.

Certains auteurs ont donc étudié l'allongement du temps de coagulation par la thrombine d'une solution de fibrinogène induit par l'addition de quantité croissante de fragment D. Toutefois, cette technique est relativement peu sensible.

I. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ETUDE DE L'INTERACTION MONOMERES-FRAGMENT D1

Nous avons réalisé au laboratoire une technique très sensible et très analytique de l'étude de l'interaction entre monomères de fibrine et fragment D1, grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux. In vivo, la fibrine formée étant souvent de la fibrine I résultant uniquement des interaction A-a, nous avons étudié l'interaction de des A monomères de fibrine (où seuls les sites A sont accessibles) avec le fragment D1. Cette technique permet d'analyser le

mode d'action de certains inhibiteurs de la fibrinoformation et de quantifier leur activité.

A. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

A une quantité fixe de des A-monomères de fibrine immobilisés sur une plaque de polystyrène, sont ajoutées des quantités progressivement décroissantes de fragment D1 (en présence et en l'absence de l'inhibiteur à étudier). Après élimination du fragment D1 en solution, donc non fixé aux monomères, la quantité de fragment D1 lié aux monomères est évaluée en ajoutant successivement à la plaque un anticorps anti-D néo (qui ne réagit pas avec les monomères), puis de l'immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline de souris marquée à la peroxydase. La quantité de peroxydase liée à la plaque dépend donc de la quantité de fragment D1 lié aux des A-monomères de fibrine.

Des réactions contrôles ont été effectuées en étudiant la fixation du fragment D1 sur du fibrinogène immobilisé dans les mêmes conditions.

B. MATERIEL ET METHODES

1) Obtention de fragment D1 (voir 2e chapitre)

2) Préparation des des A-monomères de fibrine, c'est à dire des monomères de fibrine dépourvus en fibrinopeptide A, mais possédant encore le fibrinopeptide B :

- A 1 ml de solution de fibrinogène humain Kabi à 5 mg/ml de protéine coagulable, est ajouté 0,2 ml de reptilase (FTH 50, Stago)
- Après 30 minutes d'incubation à 37°C, le caillot est soigneusement lavé, essoré, puis dissous dans 1,5 ml d'urée 4M, pH 7,5.
- La solution obtenue consiste en des monomères dépourvus de FpA, mais possédant encore le FpB.
- La teneur par monomères de la solution est évaluée par mesure de la D₀ à 282 nm en utilisant le coefficient d'extinction du fibrinogène.

3) Fixation de la solution de monomères sur la plaque de polystyrène ELISA à 96 puits. Elle est réalisée selon la technique exposée pour la fixation d'antigène insoluble à partir d'une solution de monomères à 5 µg/ml.

Dans une expérience préliminaire, afin de déterminer la quantité de monomères fixés, la solution surnageante a été récupérée, avant le lavage des plaques et diluée au 1/50, puis la teneur en monomères évaluée par cette dilution ELISA à l'aide d'Ig anti-fibrinogène (dans ces conditions, les concentrations d'urée ne gênent pas le dosage et la concentration en monomères est trop faible pour que les monomères agregent). La solution surnageante diluée renfermant moins de 10 ng/ml de monomères, il est considéré que la totalité des monomères est fixée à la plaque de polystyrène.

Deux réactions contrôles ont été effectuées. La première consiste à utiliser des plaques sensibilisées à la glutaraldehyde et sur lesquelles aucune fixation de protéine n'a été pratiquée. La deuxième consiste à fixer du fibrinogène dans les mêmes conditions

que celles utilisées pour la fixation des monomères. Comme pour les monomères, dans une expérience préliminaire, la quantité de fibrinogène fixé sur la plaque a été déterminée et il a été conclu que la totalité du fibrinogène était fixé dans ces conditions, puisque le fibrinogène n'a pas été retrouvé dans le surnageant.

En pratique, afin que les conditions soient rigoureusement identiques pour la fixation du fibrinogène et pour la fixation des monomères, une moitié de la plaque préalablement activée par la glutaraldehyde sera incubée avec le fibrinogène et l'autre moitié sera incubée avec les monomères.

4) Interaction entre monomères des A de fibrine (ou fibrinogène) et fragment D1 . Les conditions retenues pour cette interaction consistent à introduire dans chaque puits, 100 µl de fragment D1 à des concentrations progressivement décroissantes, allant de 25 µg/ml à 1,5 µg/ml.

Afin d'éviter une fixation non spécifique du fragment D1 sur la plaque, le fragment D1 a été dissous dans du PBS, contenant 0,5/1000 de tween 20 et 1/1000 d'albumine.

De plus, afin d'éviter lors de l'incubation une dégradation des monomères par des traces de plasmine susceptibles d'être présentes dans la solution de fragment D1, de l'inhibiteur de Kunitz est ajouté à la solution de fragment D1 (20000 U/ml).

Une réaction contrôle est pratiquée en remplaçant la solution de fragment D1 par du tampon PBS tween.

L'interaction monomères ou fibrinogène et fragment D1 est réalisée par incubation de 2 heures à 37°C. Au bout de ce temps d'incubation, la

plaque est lavée 4 fois dans du ClNa contenant 0,5/1000 de tween 20, afin d'éliminer le fragment D1 non combiné aux monomères (ou au fibrinogène).

5) Mise en évidence du fragment D1 lié aux monomères (ou au fibrinogène)

Elle est pratiquée par deux incubations successives de 1 heure 30 à 37 C séparées par 4 lavages avec du chlorure de sodium 0,15 M contenant 0,5/1000 de tween 20 : la première avec de l'anti-D néo utilisé à une dilution préalablement déterminée telle que la fixation de l'anticorps sur le fragment D immobilisé soit maximale (voir chapitre : Résultats des anticorps monoclonaux), la deuxième avec de l'Ig de chèvre anti-Ig de souris marquée à la peroxydase diluée au 1/1000.

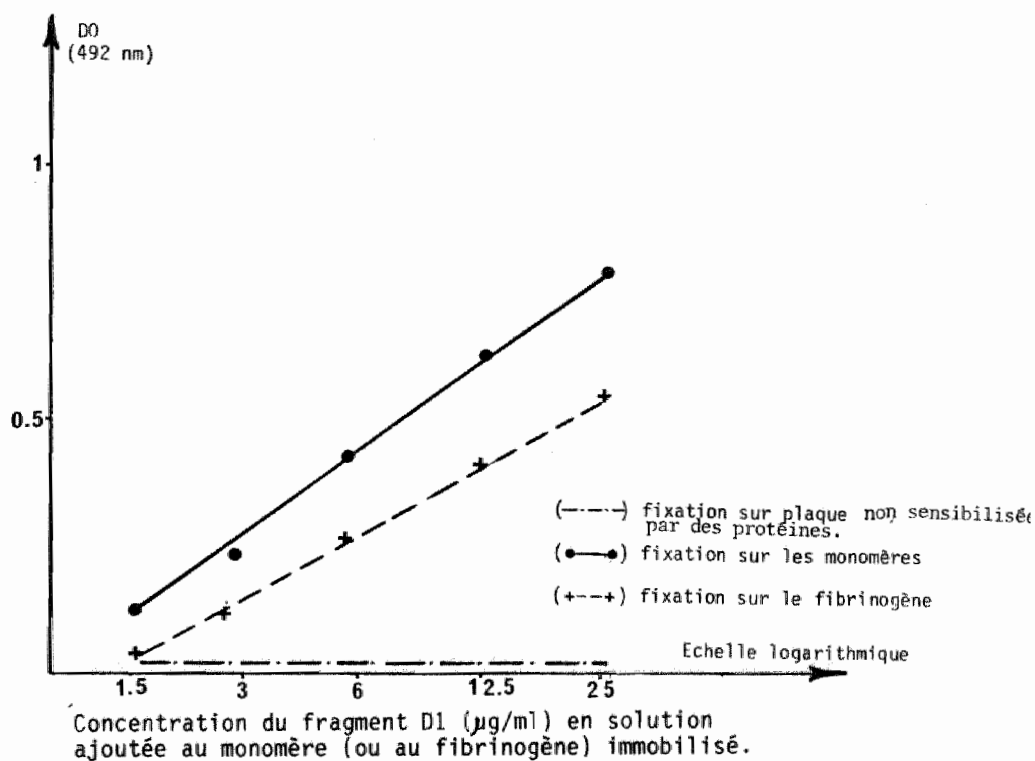
Après 4 lavages de la plaque dans les mêmes conditions, la peroxydase immune est révélée par addition de 200 μ l du réactif à l'orthophénylène diamine. Après 4 mn d'incubation la réaction est bloquée par addition de 50 μ l de SO_4H_2 2,5 N.

La densité optique à 492 nm au niveau de chaque puits révélant la peroxydase dépend de la quantité de fragment D1 fixé aux monomères (ou fibrinogène).

C. RESULTATS

Il y a une relation semi-logarithmique entre la quantité de fragment D1 incubé avec les monomères (ou le fibrinogène) et la DO

Fig. 25: Fixation du fragment D1 sur le fibrinogène et les monomères immobilisés.



après révélation de la peroxydase (Fig. 25). La quantité de fragment D1 fixée aux des A monomères est beaucoup plus importante que celle fixée au fibrinogène. Aucune fixation de fragment D1 n'est observée lorsque les plaques sont uniquement traitées par la glutaraldehyde. De plus, un contrôle a été réalisé, montrant qu'aucune immunoréactivité n'est observée lorsque le fragment D1 est remplacé par du tampon.

D. DISCUSSION

La technique réalisée ici constitue une méthode simple, sensible, reproductible et quantitative de la fixation du fragment D1 sur les monomères des A de fibrine.

- La fixation du fragment D1 au fibrinogène est toutefois controversée dans la littérature. Olexa et Budzinski, par exemple, ont trouvé que le fragment D1 ne s'accrochait pas au fibrinogène immobilisé sur du sépharose activé par le bromure de cyanogène (149).

En revanche, Pasqua et Pizzo (151) ont noté une fixation du fragment D sur le fibrinogène immobilisé sur le sépharose. Pour ces auteurs, la discordance observée entre leurs résultats et ceux d'Olexa et Budzinski serait liée au fait que ces derniers, pour séparer le fragment D libre du fragment D combiné au fibrinogène, utilisent des lavages extensifs du sépharose fibrinogène ne permettant pas de mettre en évidence des attractions faibles entre fibrinogène et fragment D. En revanche, par leur technique utilisant une dialyse à l'équilibre, les liaisons faibles ne sont pas dissociées.

- La fixation du fragment D1 au fibrinogène observée par notre technique peut être liée :

- soit à la présence de forces attractives faibles entre fibrinogène et fragment D1, comme le pensent Pasqua et Pizzo,

- soit à une fixation du fragment D1 sur du fibrinogène légèrement modifié par sa fixation sur la plaque de polystyrène.

En effet, dans le chapitre précédent, grâce à l'utilisation de deux anticorps monoclonaux, nous avons pu montrer que lors de la fixation du fibrinogène sur le polystyrène, il y avait un changement de conformation de la molécule, rendant accessible certains épitopes masqués dans le fibrinogène natif en solution.

- soit à une fixation non spécifique du fragment D1 sur les protéines immobilisées.

Quoi qu'il en soit, afin de calculer la fixation spécifique du fragment D1 aux monomères, sur le diagramme, il est mis en abscisses la quantité de fragment D1 en solution incubée avec les monomères (ou le fibrinogène immobilisé) et en ordonnées la différence entre la D0 obtenue lorsque l'incubation a lieu avec les monomères et la D0 obtenue après incubation avec le fibrinogène (Fig. 26).

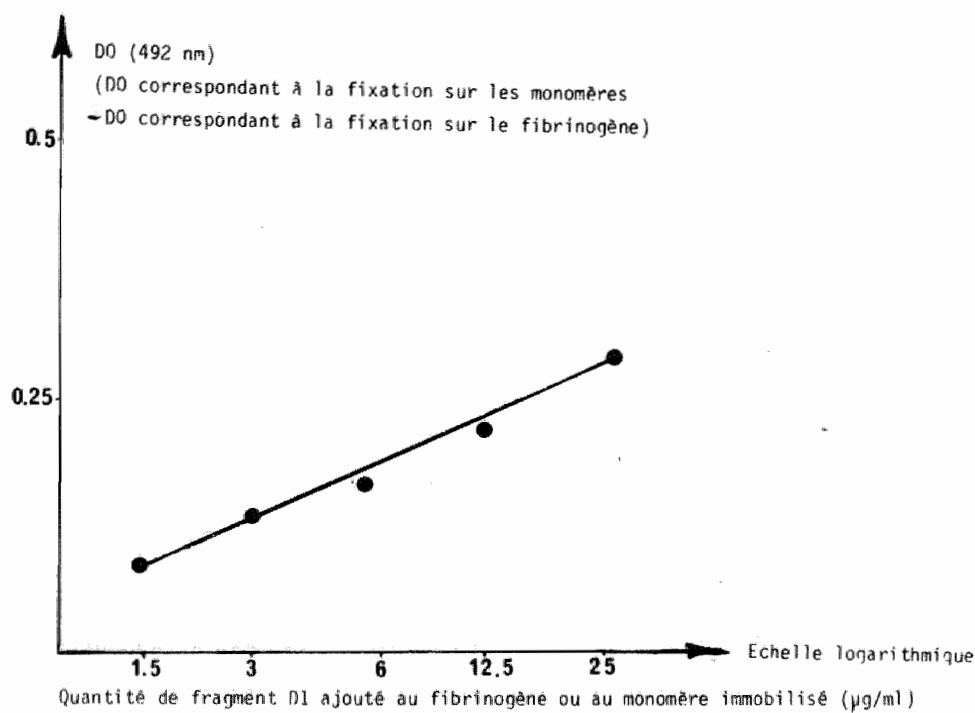


Fig. 26 : Fixation spécifique du fragment D1 sur les monomères immobilisés.

II. APPLICATION DE LA METHODE

A. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE CERTAINES SUBSTANCES INHIBANT

L'AGREGATION DES MONOMERES. DETERMINATION DE LEUR REACTIVITE

Elle est réalisée en incubant les monomères immobilisés avec une quantité donnée de fragment D1 en présence de quantités croissantes de la substance à étudier. Pour évaluer l'activité de l'inhibiteur, l'inhibition de la fixation du fragment D1 sur les monomères est déterminée en fonction de la dose de substance inhibitrice ajoutée au fragment D1.

Cette étude quantitative est très reproductible, et peut rendre de précieux services dans l'étude du mécanisme d'action de certaines drogues et dans la détermination de leur activité.

B. APPLICATION PARTICULIERE A L'ETUDE D'UN FIBRINOGENE

ANORMAL HOMOZYGOTE, LE FIBRINOGENE ALES. MISE EN EVIDENCE D'UNE ANOMALIE DU SIGE DE POLYMERISATION "a" LOCALISEE SUR LA CHAINE GAMMA

Cette étude a été effectuée en collaboration avec P. Desvignes et P. Bonnet.

De nombreux cas de dysfibrinogénémie ont été rapportés dans la littérature. Toutefois les cas homozygotes sont très rares. Du fait de la seule présence de fibrinogène anormal, l'étude de tels cas

homozygotes est très important pour étudier les relations entre anomalies de structure et de fonctions du fibrinogène.

Jusqu'à présent seulement deux cas de dysfibrinogénémie homozygote ont été publiés, il s'agit des fibrinogènes Detroit (21) et Metz (164).

Le cas présenté ici a été découvert par hasard chez un polytraumatisé et pour lequel un bilan de coagulation de routine a été effectué. Le patient ne présentait pas de tendance hémorragique anormale. De même, ni la soeur, ni les parents, qui sont cousins germains ne présentaient de tendance au saignement, ni de tendance thrombotique.

1) Matériel et méthodes ayant servi à étudier cette dysfibrinogénémie

a) Examens d'investigation biologique en coagulation

Le temps de saignement (Duke), le temps de recalcification plasmatique (Howell), le temps de Quick, l'évaluation différentielle des facteurs II, V et VII+10, le temps de céphaline-kaolin ont été réalisés selon les techniques présentées par Can, Larrieu et Samama (29).

L'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, le collagène, l'acide arachidonique a été étudiée à l'aide d'un agrégomètre coultronique. L'activité cofacteur du fibrinogène dans l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP a été déterminée en étudiant l'agrégation à l'ADP de plaquettes lavées normales obtenues selon Patscheke (152) en présence de quantité variable de fibrinogène normal ou anormal.

La concentration plasmatique en fibrinogène (29) a été

déterminée par différentes méthodes : chronométriques (Von Clauss), immunologiques (Mancini), utilisant les plaques Partigen (Laboratoires Behring) et par précipitation à 56 C.

- Le temps de thrombine et le temps de reptilase ont été mesurés par addition à un volume de plasma, d'un volume égal de thrombine (de différentes origines) ou de reptilase utilisées à différentes concentrations et en solution dans le chlorure de sodium 0,15 M ou le chlorure de calcium M/40.

- La courbe de polymérisation a été effectuée selon la technique de Bouvier et Gruedlinger (24) par enregistrement cinétique de la variation de la DO à 350 nm d'une dilution de plasma induite par addition de thrombine. La dilution du plasma utilisée dans ces cas a été de 1/3 (au lieu de 1/10 normalement).

- La teneur dans le sérum de substances ayant l'antigénicité du fibrinogène a été déterminée à l'aide de particules de latex sensibilisées avec de l'antifibrinogène (thrombo-walcotest, Laboratoires Wellcome).

- Le facteur XIII a été dosé par la technique de Josso en utilisant du fibrinogène dépourvu de facteur XIII (Laboratoire Behring) (29).

b) Analyse de la molécule de fibrinogène

Elle a été réalisée sur du fibrinogène purifié obtenu par a méthode de Blomback et Blomback (11). Le fibrinogène purifié est dissous dans du ClNa 0,15 M afin d'obtenir une solution à 10 mg/ml de protéines. Cette solution est lyophilisée en fractions de 1 ml.

- Le fibrinogène ainsi isolé est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée et de SDS (63)

- Les chaînes dissociées de ce fibrinogène ont été étudiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % en présence de SDS selon la technique de Schwartz et al. (163), et par isofocalisation en gel de polyacrylamide à 4,5 % (selon le premier stade de la technique de O'Farrell) (147) en présence d'un mélange à parties égales de pharmalytes pH 4-6 et pH 4-8 (Laboratoire Pharmacia).

La dissociation du fibrinogène en ces trois chaînes a été réalisée selon la technique de Schwartz et al. (169) par incubation pendant 18 heures à 37 °C de l'échantillon dans une solution d'urée 8 M et de mercapto éthanol à 3 %. L'incubation est réalisée en l'absence de SDS pour l'isofocalisation et en présence de 3 % de SDS en concentration finale pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

- Les produits de dégradation du fibrinogène par la plasmine non réduits ou réduits par le mercapto éthanol, ont été étudiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS selon la technique de Schwartz. La dégradation du fibrinogène par la plasmine est réalisée en présence de calcium et en présence d'EDTA selon le protocole décrit par Haverkate (84).

c) Analyse de la fibrinogenèse

Les trois étapes de la fibrinogenèse ont été étudiées séparément.

- La libération des fibrinopeptides A et B après addition de thrombine au fibrinogène purifié, a été étudiée par HPLC selon la technique de Kehl et Henschen (104) à l'aide d'un appareil Waters.

La libération du fpA après addition de reptilase au fibrinogène

purifié a également été mesuré par immunoenzymologie selon la technique de Soria et al. (170) en utilisant les réactifs Stago (Asnières, France).

- L'agrégation des monomères de fibrine a été appréciée par la technique de Belitser (7) : la solution de monomères dans l'acide acétique à 1 % est diluée dans du tampon tris-HCl pour induire l'agrégation des monomères, qui est suivie par enregistrement de la variation de densité optique à 350 nm.

- La stabilisation de la fibrine a été appréciée par la formation de dimères de chaînes gamma et de polymères de chaîne alpha. Cette analyse a été réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % en présence de SDS, après dissociation du caillot par l'urée et mercapto éthanol, selon la technique de Schwartz (163). Ont été parallèlement étudiés, le caillot provenant de la coagulation du plasma natif obtenu par centrifugation immédiate à 4 °C du sang natif recueilli sans anticoagulant et celui provenant de la coagulation par la thrombine calcique d'un échantillon de fibrinogène purifié additionné de facteur XIII (fibrogamine, Laboratoires Hoescht) à une concentration finale égale à celle présente dans le plasma, selon le protocole de Schwartz et al.

Conjointement le caillot non stabilisé provenant de la coagulation du fibrinogène par de la thrombine en présence d'EDTA a été analysé dans les mêmes conditions.

Conjointement à cette étude des trois stades de la fibrinoformation, la liaison du fragment D1 issu du fibrinogène anormal a des (des A) monomères de fibrine provenant d'un fibrinogène normal a été étudiée.

2) Résultats

a) Investigation biologique de la coagulation

Elle est résumée dans le tableau VIII. Elle a permis de déceler chez ce malade un allongement important du temps de thrombine. Ce trouble de la fibrinoformation retentit sur le temps de Quick, qui est très allongé, malgré un taux normal des facteurs II, V, VII+10. Le temps de reptilase est infini, même lorsque la reptilase est utilisée 10 fois plus concentrée que normalement.

La concentration plasmatique en fibrinogène est variable selon la technique utilisée, normale par les méthodes immunologiques ou par précipitation à 56 °C, très diminuée en revanche dans les méthodes chronométriques.

La soeur du malade présente les mêmes anomalies que celles de son frère, tandis que leur père et leur mère, qui sont cousins présentent aussi une anomalie de la fibrinoformation, mais beaucoup moins intense que celle observée chez leurs deux enfants.

b) Analyse du trouble de la fibrinoformation

- La courbe de polymérisation faite avec le plasma dilué de malade montre d'abord un allongement très important du temps de latence, puis une augmentation de la densité optique très lente. Toutefois, compte tenu de la concentration plasmatique en fibrinogène, la DO finale du caillot est normale (figure 27).

- L'addition de chlorure de calcium à la thrombine n'induit aucun raccourcissement du temps de thrombine.

Tableau VIII : Investigations biologiques de routine permettant d'explorer la coagulation.

	Patient	Soeur	Père	Mère	Contrôle
Temps de saignement (mn)	3	1,30	ND	ND	2-4
Plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	200	280	ND	ND	200-400
Agrégation plaquettaire	NI	NI	NI	NI	
Temps de coagulation (mn)	8	9	7	7	5-9
Temps de Quick (sec)	>180	>180	16	15,5	13
Facteur II (%)	100	100	100	100	80-100
VI+10 (%)	100	100	100	100	80-100
V (%)	100	100	100	100	80-100
Temps de cephaline					
Kaolin (sec)	>180	>180	34	36	32
Temps de thrombine (sec)					
/ClNa	600	780	30	30	20
/Cl2ca	60	60	10	10	10
Temps de reptilase (sec)					
reptilase x 1			ND	ND	17
reptilase x 10			ND	ND	10
Fibrinogène mg/100 ml					
- technique chronométrique	<20	<20	80	80	200-400
- précipitation à 56°C	315	330	370	400	200-400
- technique immunol.	305	302	400	400	200-400
Matériel ayant l'anti-génicité du fibrinogène					
dans le sérum : $\mu\text{g/ml}$	20	20	ND	ND	20

NI : Normal

ND : Non Déterminé

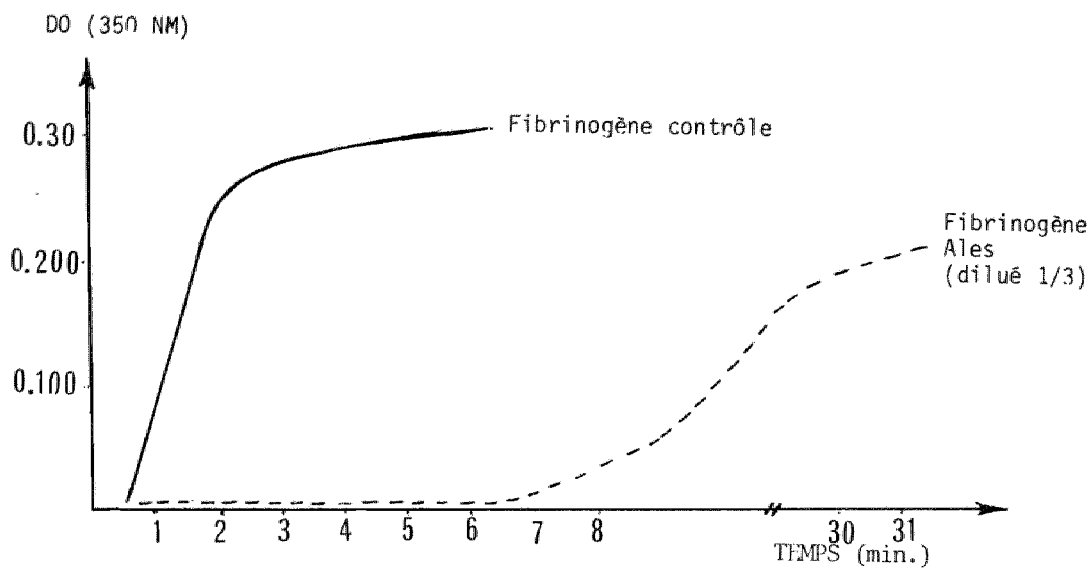


Fig. 27 :

Courbe de polymérisation du fibrinogène Ales après addition de thrombine.

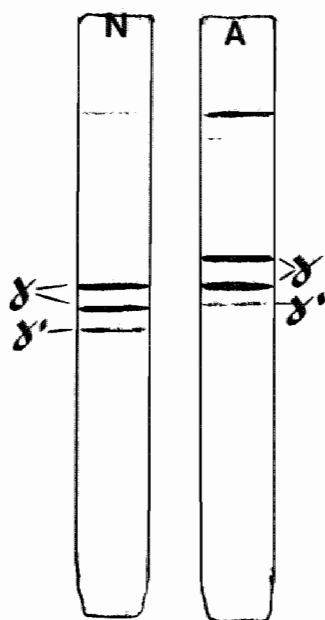


Fig. 28

Isofocalisation des chaînes dissociées du fibrogène
(N : fibrinogène normal)
(A : fibrinogène Ales).

- Le même allongement du temps de thrombine que celui observé avec le plasma du malade et l'absence de coagulation par la reptilase (même à une concentration 10 fois supérieure à celle utilisée normalement) s'observe aussi avec le fibrinogène purifié.

c) Analyse de la molécule de fibrinogène

- Par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) du fibrinogène non réduit, le fibrinogène anormal possède le même poids moléculaire apparent que celui du fibrinogène normal isolé dans les mêmes conditions.

- Par SDS-PAGE des trois chaînes dissociées du fibrinogène, aucune anomalie n'a été décelée,

- Par isofocalisation des trois chaînes du fibrinogène en revanche, la migration de la chaîne gamma-gamma' du fibrinogène anormal est bien anodique que celle de la chaîne gamma-gamma' du fibrinogène normal, comme le montre la figure 28.

- Par SDS-PAGE des produits de dégradation du fibrinogène anormal obtenus par dégradation du fibrinogène par la plasmine en présence de calcium et en présence d'EDTA, aucune anomalie n'a pu être décelée : en présence de calcium obtention de fragment D1 et E, en présence d'EDTA obtention des fragments D3 et E.

d) Etude des différents stades de la fibrinoformation

- Les fibrinopeptides A et B ont été libérés normalement après action de la thrombine sur le fibrinogène. Aucune anomalie de structure des fibrinopeptides n'est décelable. En effet, le profil d'élution en HPLC des FpA et FpB provenant du fibrinogène anormal

s'est révélé identique à celui issu du fibrinogène normal. De plus, les quantités de FpA et de FpB libérés du fibrinogène anormal sont identiques à celles libérées à partir du fibrinogène normal (Fig. 29).

De même le fibrinopeptide A est libéré normalement du fibrinogène anormal après action de la reptilase, comme il a été déterminé par dosage immunoenzymologique. En effet, 30 µg/ml de FpA ont été libérés d'une solution de fibrinogène à 3 mg/ml traité par la reptilase, qu'il s'agisse du fibrinogène normal ou du fibrinogène anormal.

- L'agrégation des monomères de fibrine est très anormale puisque dans les conditions décrites par Belitser aucun caillot ne se forme à partir des monomères issus du fibrinogène anormal, alors qu'un caillot se forme en moins de 5 minutes à partir des monomères normaux.

- La stabilisation de la fibrine est normale dans cette dysfibrinogénémie, puisque l'analyse par SDS-PAGE du caillot dissocié a montré la présence de dimères de chaînes gamma et de polymères de chaînes alpha (Fig. 30).

e) Etude de l'interaction du fragment D1 à des monomères (des A) de fibrine normaux.

Comme il est objectivé dans la figure 31, la fixation du fragment D1 issu du fibrinogène normal aux des A monomères normaux est très supérieure à la fixation du fragment D1 provenant du fibrinogène anormal aux mêmes des A monomères normaux de fibrine.

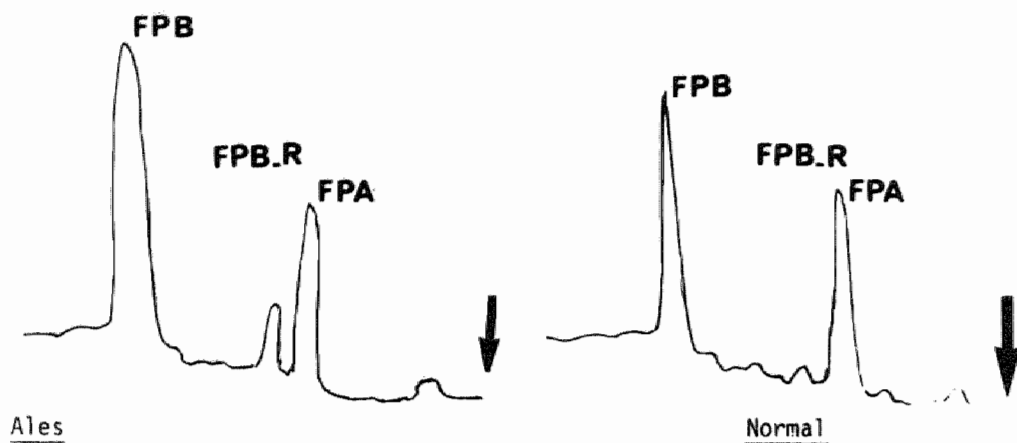


Fig 29 Etude par HPLC de la libération des fibrinopeptides A et B après addition de thrombine au fibrinogène.

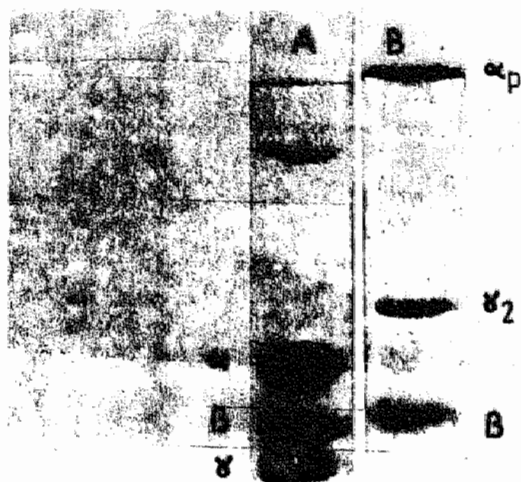


Fig 30

Etude de la stabilisation de la fibrine Ales

A : caillot non stabilisé

B : caillot stabilisé

Electrophorèse en gel de polyacrylamide + SDS avec caillot dissocié par l'urée et le marcapto-éthanol.

Fig 31: Fixation des fragments D1 provenant du fibrinogène normal et du fibrinogène Ales sur le fibrinogène et les monomères normaux immobilisés.

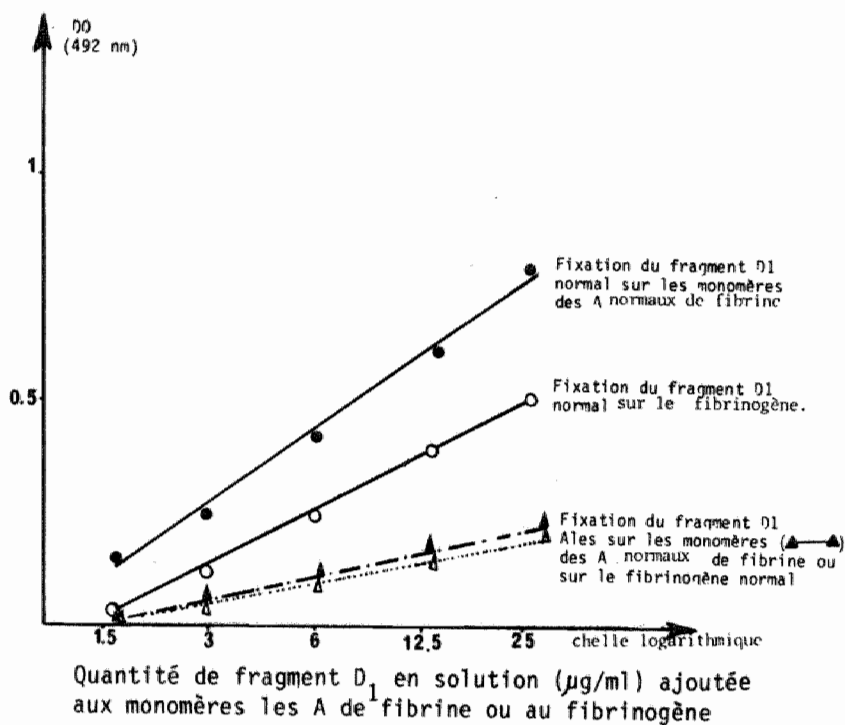
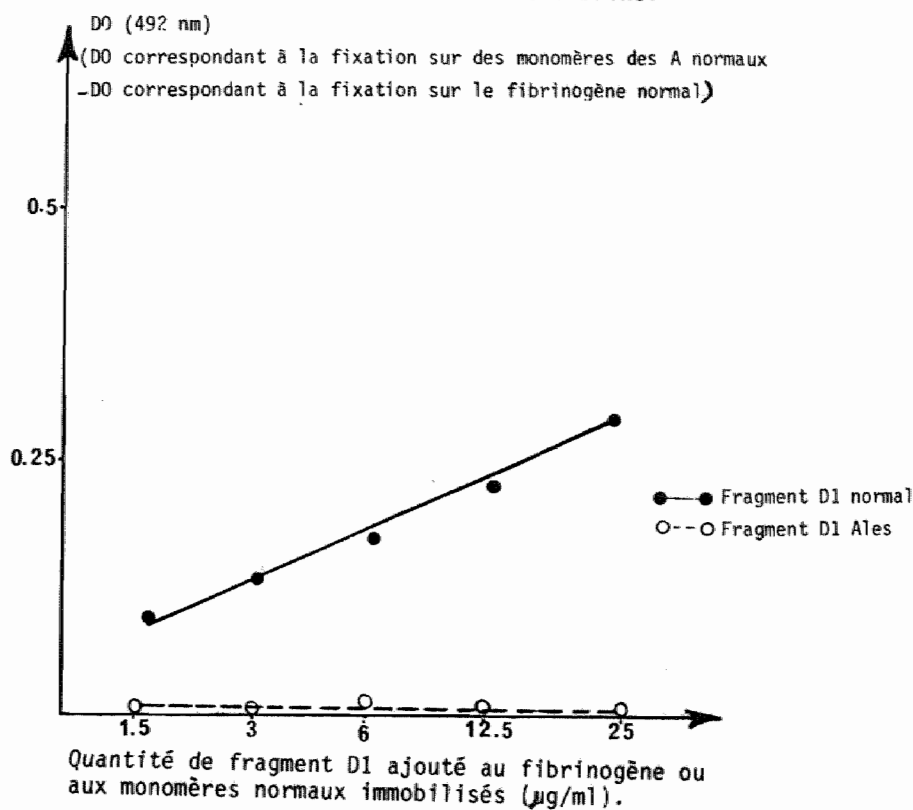


Fig 32: Fixation spécifique des fragments D1 provenant du fibrinogène normal et du fibrinogène Ales sur des monomères (des A) normaux de fibrine.



De plus, contrairement à ce qui est observé avec le fragment D1 normal, l'interaction du fragment D1 provenant du fibrinogène anormal, avec les (des A) monomères normaux est identique à celle observée avec le fibrinogène normal.

Ainsi il ne semble y avoir aucune fixation spécifique de fragment D1 à des monomères (des A) de fibrine (Fig. 32).

f) L'activité cofacteur d'agrégation plaquettaire du fibrinogène anormal dans l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP est strictement superposable à celle du fibrinogène normal.

3) Discussion

La dysfibrinogénémie homozygote présentée ici est particulièrement intéressante. En effet, il y a un grand retard à la coagulation du fibrinogène par la thrombine, mais il n'y a pas de coagulation du fibrinogène par la reptilase. La coagulation du fibrinogène par la thrombine est uniquement retardée, puisque la quantité de matériel ayant l'antigénicité du fibrinogène dans le sérum est inférieure à 20 gamma/ml, témoignant de l'absence de fibrinogène non coagulé dans le sérum, ou l'absence de monomères.

- Concernant l'anomalie de structure de la molécule, elle a pu être localisée sur la chaîne gamma de la molécule puisque par isofocalisation des chaînes dissociées du fibrinogène, il a pu être montré que la chaîne gamma-gamma' issue du fibrinogène anormal, avait un point isoélectrique supérieur à celui de la chaîne gamma-gamma' normale. De plus, la dégradation du fibrinogène anormal par la plasmine est identique à celle du fibrinogène normal, puisque en

présence de chlorure de calcium il y a formation de fragment D1 et E et que en présence d'EDTA il y a formation de fragment D3 et E.

- Concernant l'anomalie de la fibrinoformation, elle a pu être liée à un trouble important de l'agrégation des monomères de fibrine, tandis que la libération des fibrinopeptides et la stabilisation de la fibrine sont normales.

Compte tenu que :

- 1) l'anomalie est localisée à la chaîne gamma de la molécule
- 2) que le trouble de la fibrinoformation est lié à une agrégation défectueuse des monomères de fibrine,

- 3) que le fragment D1 issu du fibrinogène anormal ne se lie pas aux monomères (des A) de fibrine normaux ayant disponibles les sites de polymérisation "A" (et non "B", puisque le fpB n'a pas été libéré), il en a été conclu que l'anomalie devait être localisée au niveau du site "a", localisé dans le fragment D1, à l'extrémité C terminal de la chaîne gamma, site complémentaire du site "A" présent dans les (des A) monomères de fibrine.

Cette constatation explique donc la discordance observée entre la coagulation de ce fibrinogène par la thrombine d'une part, et son incoagulabilité par la reptilase d'autre part. En effet, lors de l'attaque du fibrinogène par la thrombine, libérant le fpA et le fpB, les sites "A" et "B" deviennent accessibles, mais du fait de l'anomalie localisée au niveau des sites "a", entraînant de ce fait l'absence d'interaction A-a, la coagulation du fibrinogène par la thrombine est uniquement liée à l'interaction des sites "B" et des sites "b".

Au contraire, lors de l'attaque du fibrinogène par la reptilase, le

fpA est libéré normalement, rendant accessible le site "A", tandis que le fpB n'étant pas libéré, le site "B" reste masqué. De ce fait, alors que pour le fibrinogène normal, l'interaction A-a suffit pour former un caillot, pour le fibrinogène anormal, du fait de l'absence d'interaction A-a liée à l'anomalie du site "a", ce fibrinogène anormal ne peut pas coaguler par la reptilase.

De telles expériences ont donc permis de mettre en évidence une anomalie au niveau du site a de polymérisation. Cette anomalie est particulièrement intéressante car jusqu'à ce jour la nature du site a était encore inconnue et l'étude d'un tel fibrinogène anormal devrait permettre de localiser ce site sur la chaîne gamma.

DOSAGE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA FIBRINE OU DU FIBRINOGENE DIRECTEMENT DANS LE PLASMA

Les dosages des produits de dégradation de la fibrine (PDFb) constituent actuellement (en association avec la recherche de complexes solubles dans le plasma) une investigation biologique courante pour le diagnostic des coagulations intra-vasculaires. Plusieurs méthodes de dosage des PDFb ont été décrites, le fibrinogène interférant il faut donc pratiquer le dosage dans le sérum.

I. RAPPEL DES TECHNIQUES UTILISEES ACTUELLEMENT EN BIOLOGIE CLINIQUE

A. METHODES BASEES SUR UNE REACTION ANTIGENE-ANTICORPS

Les méthodes les plus courantes utilisent une réaction antigène-anticorps. Elles sont toutes effectuées à l'aide d'antisérum polyclonaux antifibrinogène ou anti D + anti E. Les techniques les plus couramment utilisées sont : la technique de Merskey d'une part, la technique au latex d'autre part.

1) La technique de Merskey (134). Elle est basée sur le fait que l'hémagglutination de globules rouges sensibilisés par du fibrinogène lié à l'addition d'un antisérum anti-fibrinogène est inhibée par l'incubation préalable de l'anticorps avec une quantité suffisante de

produits de dégradation de la fibrine. De la plus grande dilution de l'échantillon analysé incubé avec l'anticorps induisant une inhibition de l'hémagglutination, il est déduit la concentration en PDFb dans le prélèvement. Cette technique est sensible et reproductible, toutefois, les réactifs sont longs à préparer et ont une durée de conservation limitée (6 semaines). De plus, lors de la détermination des PDFb, deux incubations de 30 minutes chacune sont pratiquées, la technique ne peut donc être réalisée rapidement, ce qui limite son utilisation. Par cette technique, le fragment E n'est pas révélé (171).

2) La technique au latex sensibilisé par un mélange d'Ig anti-D et d'Ig anti-E est en revanche très utilisée. Elle consiste à déterminer la plus grande dilution de l'échantillon à analyser qui induit en 2 minutes l'agglutination des particules de latex sensibilisé. La réaction est donc très rapide à effectuer, de plus, des réactifs commerciaux de bonne conservation sont disponibles.

B. LE STAPHYLO CLUMPING TEST

Le "staphyloclumping test" est une méthode basée sur l'agglutination de certaines souches de staphylocoques par le fibrinogène et certains de ces dérivés (2, 116). Il suffit donc de déterminer la plus grande dilution de l'échantillon à analyser qui induit encore l'agglutination de la suspension de staphylocoques. Cette technique mise au point par Hawiger et al. (85) ne décèle que les produits très précoces de dégradation. En effet, Strong et al. ont montré que c'était le peptide gamma 397-411 éliminé lors de la

conversion du fragment D1 en fragment D3 qui se fixait sur les souches de staphylocoque (177). Cependant, pour que l'agglutination apparaisse il faut que ce peptide soit exposé symétriquement de chaque côté de la molécule, le fibrinogène réalisant ainsi des ponts entre deux staphylocoques (32). En revanche, les produits de dégradation asymétriques ne renfermant qu'un seul peptide gamma 397-411 bloquent les récepteurs au niveau des souches de staphylocoques, sans entraîner d'agglutination.

Pour toutes ces techniques, quand la coagulation du sang est très retardée ou incomplète, deux heures après l'obtention du caillot, il peut rester en solution du fibrinogène non coagulé ou des monomères ne polymérisant pas interférant donc avec le dosage des PDFb.

L'obtention d'anticorps réagissant avec les PDFb et ne réagissant pas avec le fibrinogène est donc particulièrement intéressante. Une technique de dosage des PDFb utilisant de tels anticorps, présente en outre l'avantage de pouvoir réaliser toute l'investigation biologique de la coagulation sur un seul prélèvement de sang recueilli sur citrate trisodique 0,13 M (1 volume pour 9 volumes de sang) et permet en outre de réaliser l'examen souvent urgent sitôt le prélèvement effectué, puisqu'il n'est plus nécessaire alors d'attendre la coagulation complète du sang.

Les anticorps monoclonaux anti-D néo peuvent donc être utilisés dans ce but.

II. TECHNIQUES DE DOSAGE DES PRODUITS DE DEGRADATION
DE LA FIBRINE PAR UTILISATION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX ANTI D-NEO

A. TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMOLOGIQUE DE RYLATT ET AL.

Les premiers Rylatt et al. (161) ont utilisés une technique de dosage des PDFb directement dans le plasma, puisque leur anticorps révèle un épitope présent dans le dimère D-D mais masqué dans le fibrinogène intact et le fragment D, permettant en outre de différencier les produits de dégradation de la fibrine PDFb, des produits de dégradation du fibrinogène PDFg. La technique qu'ils utilisent pour doser les PDFb dans le plasma, bien qu'intéressante, est une technique ELISA longue à réaliser et donc non applicable en laboratoire de routine. Elle consiste à capter de façon spécifique les PDFb de l'échantillon par leur anticorps monoclonal purifié fixé sur une plaque de polystyrène spécifique du fragment D-D et ne révélant pas le fibrinogène. Puis, dans un deuxième temps les PDFb liés au polystyrène sont révélés par un deuxième anticorps monoclonal marqué à la peroxydase, révélant aussi bien le fibrinogène que les PDFb. Le deuxième anticorps monoclonal doit révéler un épitope assez éloigné de l'épitope détecté par le premier anticorps, afin de ne pas avoir de problème d'encombrement stérique.

B. TECHNIQUE PERSONNELLE AU LATEX

La technique réalisée dans notre laboratoire est un test au latex. Sur la suggestion des laboratoires Diagnostica Stago (Asnières, France), nous avons envisagé de fixer les anticorps monoclonaux anti-D néo sur des particules de latex afin de développer un test pratique de dosage des PDFb dans le plasma.

1) Principe

Des particules de latex sensibilisées avec des Ig purifiées anti-D néo ont été préparées. Les particules agglutinent en présence d'une quantité suffisante de PDFb ou de fragment D.

2) Matériel et méthodes

- Plasma citraté obtenu par centrifugation à 1000 g de sang recueilli sur citrate dissodique 0,13 M (1 volume pour 9 volumes de sang)

- Particules de latex en polystyrène stabilisé de $0,3 \mu$ de diamètre (Rhône Poulenc).

- Obtention des Ig purifiées à partir de l'ascite de souris injectée avec les hybrides DSB14. Elle a été réalisée selon la technique de Boschetti et al. (22) : après précipitation des Ig par le sulfate d'ammonium, le précipité est dissous, filtré sur une colonne de CF05 (laboratoires IBF) puis le pic de protéine est soumis à une double chromatographie échange d'ions, la première sur DEAE tris acryl

(IBF) avec élution en gradient de 0 à 0,3 M de NaCl en tampon phosphate 0,01 M pH 8. La deuxième sur CM tris acryl (IBF) en tampon phosphate 0,01 M pH 6, suivie d'une élution par du ClNa 0,5 M dans le tampon pH 6. La fraction protéique correspondant aux Ig est repérée par la technique immunoenzymologique directe utilisée pour la mise en évidence de la sécrétion d'hybridomes.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS, selon Weber et Osborn (185) il a pu être montré que cette fraction renferme au moins 95 % d'immunoglobulines.

- La sensibilisation du latex avec les Ig provenant de l'ascite de souris qui avait été injectée avec des hybridomes anti-D néo a été pratiquée selon Singer et Plotz (166).

- Le dosage des PDFb s'effectue directement dans le plasma : la plus petite dilution du plasma en tampon glycine pH 8,35 induisant encore l'agglutination des particules de latex sensibilisées est déterminée. L'étalonnage de la technique est effectué avec du fragment D purifié et avec des PDFb isolés.

Sur une plaque de verre sont déposés successivement 0,1 ml de dilution de plasma et 0,025 ml de suspension de latex. Après mélange des particules de latex à la dilution de plasma, à l'aide d'un agitateur, la plaque est soumise à une oscillation douce pendant 5 minutes. Le temps nécessaire à l'apparition de l'agglutination est mesuré. Seules les agglutinations n'apparaissant en moins de 5 minutes doivent être retenues.

- Les résultats obtenus ont été confrontés avec le bilan d'investigation biologique de coagulation et en particulier aux

fibrinogène n'interfère pas avec le dosage des PDF, aucune cause d'erreur n'a été observée, même chez les sujets présentant une hyperfibrinémie à 8 g/l. De plus, les résultats obtenus par agglutination des particules de latex sensibilisées à l'anti-D néo sont comparables avec ceux obtenus avec le thrombo Welco test. Les calculs statistiques n'ont pas été réalisés. En effet, les dilutions effectuées de l'échantillon à analyser sont des dilutions arithmétiques pour déterminer la plus grande dilution de cet échantillon entraînant encore une agglutination des particules de latex.

Ceci explique que la concentration des PDF dans l'échantillon est comprise entre deux concentrations, allant du simple au double.

La différence de réactivité de l'anticorps monoclonal DSB14 pour le fragment D et pour les produits de dégradation de la fibrine PDFb, qui avait été observé dans le test immunoenzymologique par compétition, n'apparaît pas dans le test au latex. Cette différence de réactivité de l'anticorps selon la technique utilisée peut être expliquée aisément par le fait que les durées d'incubation des produits de dégradation de la fibrine ou du fibrinogène avec l'anticorps sont très différentes. Moins de 5 minutes à la température du laboratoire pour le test au latex et 18 heures à 4 C pour le test immunoenzymologique.

La mise au point de techniques utilisant ces particules de latex est très délicate, comme l'ont souligné Daniel (41) et Grémy (78).

En particulier, le choix des particules de latex doit être très rigoureux. En effet, les particules de latex sont constituées par

complexes solubles effectués avec le kit Stago FSPrest.

3) Résultats

a) Contrôle de la validité des particules de latex sensibilisées

- le fragment D à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ induit l'agglutination des particules de latex en moins de 3 minutes.
- les PDFb à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ induisent également l'agglutination des particules de latex dans les mêmes conditions.
- les plasmas citratés provenant de 50 sujets témoins normaux dilués au 1/4 dans le tampon glycine pH 8,35 n'ont jamais induit d'agglutination des particules de latex, ce qui correspond à une concentration en PDFb inférieure à 20 $\mu\text{g/ml}$.

b) Etude des prélèvements de malades

Le tableau IX expose les principaux résultats de prélèvements de malades et montre que, chaque fois que les complexes solubles sont positifs, la teneur plasmatique en produits de dégradation de la fibrine est assez élevée. Il y a donc une bonne correspondance entre les deux tests. De plus, il y a également une bonne correspondance entre la technique classique utilisant le thrombo-welco-test, effectuée dans le sérum et notre technique utilisant un anticorps monoclonal anti-D néo effectuée dans le plasma.

4) Discussion

La technique que nous avons mise au point est très utile dans l'investigation biologique de routine pour dépister les coagulations intra vasculaires. Des résultats obtenus, il ressort que le

Tableau IX :
PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS EN VUE DE DECELER UNE ACTIVATION EVENUELLE DE LA COAGULATION

MALADES	DIAGNOSTICS	Plaag. (10 ³ /μl)	I.QUICK %	V %	VII+X %	II %	C.S. M/T	TCK (sec.) M/T	TT (sec.) M/T	Fg (g/l)	FDP (μg/ml)	
											ICL	IACMc
GIL...	Pleurésie néoplasique	-	29	41	70	70	+++	75/45	28/17	0,33	120	100
NAD...	Hémorragie post-partum	110	-	50	85	65	+++	73/48	60/19	0,5	-	200
FOR...	Polytraumatismes + pou- mon de choc	50	35	30	40	35	+++	-	20/16	2,6	-	500
MOR...	Septicémie + purpura	250	35	30	60	50	+	68/45	19/20	2,6	-	50
BEL...	Embolisation d'angiome(J1) (J2) (J3)	- 150 -	82 40 -	- 50 55	- 38 75	- 39 75	+++ ++ -	49/45 - -	- -	1,3 0,60 0,80	160 320 320	200 350 350
MEH...	Rétention de fœtus mort	250	100	-	-	-	++	36/48	-	6	40	80
JEL...	Hémolyse + hyperthermie	120	60	75	70	75	++	50/45	22/17	3,75	40	60
SCH...	Maladie inflammatoire	160	55	85	45	65	-	-	-	8,20	-	20
FER...	Angiome	-	65	58	90	90	-	-	-	-	20	20
SEY...	Thrombopénie à l'Héparine	15 40	75	100	100	100	+++	-	120/16	1,25	60	50
											120	100
											120	100
KHA...	Maladie de Still	220	32	29	37	40	+++	-	30/19	0,95	160	200
	Maladie de Still (+Héparine)	160	24	47	45	35	+++	-	-	0,33	100	100
KAL...	Abcès cérébral	90	75	70	69	80	++	34/44	-	4,4	75	75
VES...	Hypertension portale (anas- tomose porto-cave)	110	63	66	51	75	+++	51/44	19/17	3	75	75

C.S. = complexes solubles - I.C.K. = temps de Cephaline Kaolin - I.I. = temps de Thrombine - Fg = fibrinogène
M = Malade T = Témoin

FDP - ICL = technique classique utilisant un anti-fibrinogène polyclonal
IACMc = technique personnelle utilisant le latex sensibilisé avec l'anticorps monoclonal anti-Dn60

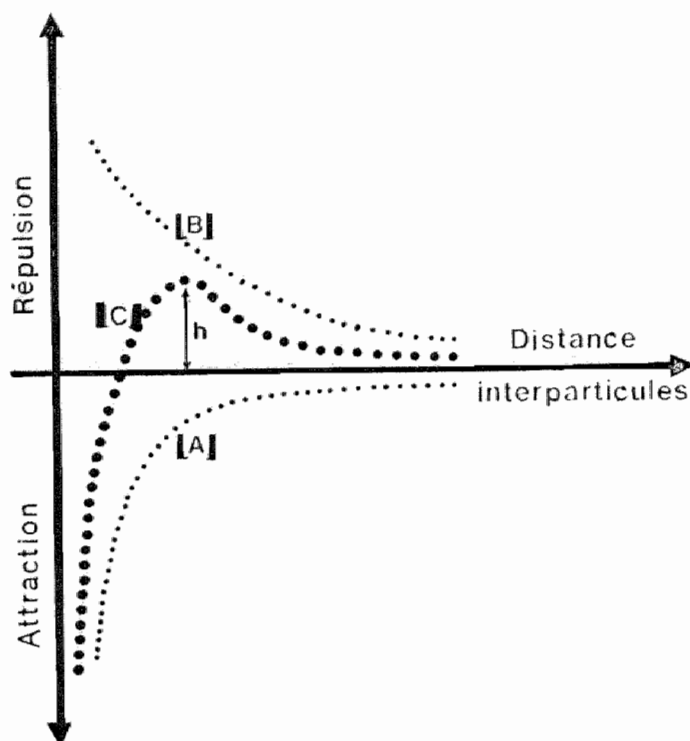


Fig. 33 : Différentes forces d'attraction entre les particules de latex, responsables de l'agglutination des particules.

un ensemble de particules de polymères monodispersées dans une phase aqueuse. Ces particules de latex soumises à l'action de deux types de force qui agissent en sens inverse (Fig. 33)

- des forces d'attraction de type London-van der Waals qui s'exercent à très courte distance (courbe A)
- des forces de répulsion d'origine électrostatique dont l'intensité en fonction de la distance varie selon une loi différente (courbe B).

Il en résulte que les particules sont soumises à un potentiel dont la valeur dépendra de la distance interparticulaire (courbe C). De cette courbe C, il ressort que pour que les particules soient maintenues éloignées les unes des autres (latex stable) la barrière de potentiel doit être de h . La valeur de h est en relation avec la stabilité du système. " h " dépend de paramètres variés comme :

- la densité des charges à la surface des particules
- la force ionique du milieu aqueux
- la constante diélectrique de la phase aqueuse.

Toute action sur ces paramètres modifie donc la stabilité du système.

En outre, les particules de latex sont stabilisées par un agent émulsifiant. Les émulsifiants non ioniques sont constitués de molécules comportant une partie hydrophobe leur permettant de se fixer fortement sur les particules et de longues séquences hydrophiles qui se déploient dans la phase aqueuse. L'effet stérique introduit par de longues séquences hydrophiles de l'émulsifiant empêche les particules de se rapprocher suffisamment. Les quantités d'émulsifiant doivent être aussi faibles que possible, car l'émulsifiant entre en compétition avec les molécules biologiques dans le processus

d'adsorption.

Lorsque le latex est recouvert d'Ig, il constitue le latex "sensibilisé". Ce latex sensibilisé mis en présence de l'antigène correspondant est déstabilisé du fait de la modification de charge induite par la formation de complexes antigène-anticorps. Cette déstabilisation crée des liaisons entre les différentes particules se traduisant par l'apparition d'agglutinats.

Ceci explique donc que la qualité du latex à utiliser doit être bien standardisée, en particulier,

- les particules doivent être de taille bien définie et la distribution granulométrique doit être la plus étroite possible, afin que la surface spécifique soit bien connue et identique d'une particule à l'autre. En effet, le fait de disposer de particules identiques implique que toutes les particules précipitent en même temps lors de la formation du complexe antigène-anticorps. Cette précipitation brutale facilite la lecture du résultat.

- La stabilité du latex doit également être suffisante pour permettre d'analyser des milieux biologiques, en général riches en électrolytes.

Compte tenu de toutes ces précautions à prendre, qui dépendent donc surtout de la qualité de latex utilisé, la technique au latex est une technique facile à réaliser en laboratoire.

Il est toutefois intéressant de noter que c'est la première fois à notre connaissance qu'un anticorps monoclonal est utilisé dans un test au latex.

Le fait que l'agglutination des particules de latex sensibilisées soit lié à une déstabilisation de charge des particules

lors de la formation du complexe antigène-anticorps, nous a conduit à mettre au point ce test, qui nous semble particulièrement intéressant. En effet, par une technique rapide il est possible de doser les produits de dégradation de la fibrine directement dans le plasma, évitant ainsi de nombreuses causes d'erreurs liées à une coagulation incomplète du fibrinogène.

CONCLUSION

Les anticorps monoclonaux sont très utiles en biologie fondamentale pour étudier la configuration d'une molécule. En biologie appliquée, ils sont particulièrement intéressants pour différencier différents produits du métabolisme d'une protéine, ou pour doser spécifiquement une molécule incorporée dans un complexe protéique et douée d'une propriété particulière. C'est ainsi que différentes méthodes ont été décrites pour doser le facteur VIII coagulant immunologiquement sans doser le facteur VIII Willebrand associé à cette molécule (f. VIII, Cag).

Au cours de ce travail nous avons préparé des anticorps monoclonaux à partir de lymphocytes de souris immunisées avec des produits de dégradation de la fibrine.

Nous avons sélectionné différents clones qui ont pu être classés en différents groupes :

1) Anticorps reconnaissant un épitope accessible sur la molécule de fibrinogène et sur un de ses fragments de dégradation (D ou E).

Parmi ces anticorps, nous avons sélectionné des anticorps capables de différencier le fragment de dégradation D1 du fragment D3 plus dégradé.

2) Anticorps capable de déceler un épitope accessible sur le fibrinogène fixé sur un support de polystyrène mais non accessible sur le fibrinogène en solution.

Ces anticorps permettent donc de déceler une modification de conformation secondaire à la fixation du fibrinogène sur un support solide.

3) Anticorps reconnaissant un épitope inaccessible sur la molécule de fibrinogène et qui ne devient accessible qu'après dégradation de la molécule.

4) Anticorps reconnaissant un épitope accessible au niveau du fragment E isolé et de la molécule de fibrinogène et inaccessible au niveau du complexe D-D-E issu de la dégradation de la fibrine stabilisée.

A l'intérieur de ces groupes différents sous-groupes ont pu être définis

- selon que l'épitope reconnu est localisé sur une chaîne isolée de la molécule de fibrinogène ou au contraire représente un épitope de conformation

- selon que l'anticorps monoclonal révèle plus les produits de dégradation de la fibrine que les produits de dégradation du fibrinogène.

L'obtention de ces anticorps nous a permis :

- 1) De mettre au point une technique originale immunoenzymologique de la polymérisation des monomères de fibrine. Elle consiste à étudier la fixation du fragment D1 contenant le site de polymérisation "a" sur des monomères de fibrine contenant des sites complémentaires "A" de polymérisation.

Cette technique aura de nombreuses applications, tant sur le plan pharmacologique, que sur l'étude d'anomalies du fibrinogène.

Ce travail nous a permis de montrer que dans le fibrinogène Ales, le

site "a" n'était pas fonctionnel car il n'y avait pas de fixation du fragment D1 Ales sur des monomères normaux (des A) de fibrine. Cette étude associée à l'étude structurale du fibrinogène Ales devrait nous permettre d'apporter des précisions sur la nature du site "a" de polymérisation au niveau de la fibrine.

2) D'étudier l'interaction du fibrinogène avec les biomatériaux grâce à l'utilisation de certains anticorps de conformation.

3) De doser les produits de dégradation de la fibrine directement dans le plasma grâce à l'utilisation d'anticorps anti D-néo.

Cette nouvelle technique pourra avoir des implications pratiques très importantes car elle apporte une modification fondamentale dans le dosage des PDF. En effet, par la technique traditionnelle, les causes d'erreur en excès sont fréquentes attribuables à la présence dans le sérum de petites quantités de fibrinogène non coagulé. De plus, nous avons montré que contrairement aux réactions de précipitation, cette technique utilisant l'agglutination de particules de latex était tout à fait réalisable avec les anticorps monoclonaux.

SAMENVATTING.

Monoclonale antilichamen zijn van groot nut in de fundamentele biochemie om de configuratie van een molecuul te bepalen. In de toegepaste biochemie zijn het buitengewoon interessante hulpmiddelen om verschillende afbraak- en metabole producten van een eiwit te onderscheiden of om specifiek één molecuulsoort te bepalen ook al bevindt hij zich in een complex mengsel of als hij gebonden is aan andere moleculen. Zo zijn er bijvoorbeeld verschillende methoden beschreven om stofactor VIII immunologisch te bepalen zonder de von Willebrandfactor, die daarmee geassocieerd is, de bepaling stoort. In het voorliggende werk hebben wij beschreven hoe monoclonale antilichamen werden gemaakt uitgaande van lymfocyten van muizen die geïmmuniseerd waren met afbraakproducten van fibrine.

Wij hebben klonen uitgezocht die antilichamen gaven die in verschillende groepen onderverdeeld kunnen worden:

- 1) Antilichamen die een epitoom herkennen dat toegankelijk is op het fibronogeenmolecuul en op zijn fragmenten D of E. Van deze antilichamen hebben wij er uitgezocht die in staat waren het afbraakproduct D1 van het verder afgebroken product D3 te onderscheiden.
- 2) Antilichamen die een epitoom aan het licht brengen dat aanwezig is op fibrinogeen dat zich aan polystyreen heeft gehecht maar niet op fibrinogeen in oplossing. Deze antilichamen maken het dan mogelijk de conformatieverandering van het fibrinogeen te detecteren die het gevolg is van hechting aan een vaste fase.
- 3) Antilichamen die een epitoom herkennen dat niet toegankelijk is op het intacte fibrinogeenmolecuul maar dat slechts toegankelijk wordt als het molecuul wordt afgebroken.
- 4) Antilichamen die een epitoom herkennen dat beschikbaar is in het geïsoleerde E fragment en het intacte fibronogeen-

molecuul maar dat ontoegankelijk is in het D-D-E complex dat uit afbraak van gestabiliseerd fibrine ontstaat.

Binnen deze verschillende groepen hebben wij sub-groepen kunnen onderscheiden naar gelang

- het epitoom dat herkend wordt, gelocaliseerd is op een geïsoleerde keten van het fibrinogeen molecuul of juist een conformatie-epitoom is.

- het monoclonale antilichaam afbraakproducten van het fibrine of van fibrinogeen aantoon.

Het verkrijgen van deze antilichamen heeft ons in staat gesteld om:

- 1) Een oorspronkelijke immunologische techniek te ontwikkelen die de polymerisatie van fibrine monomeren aantoon. De grondslag van deze techniek is het aantonen van de hechting van D1 fragmenten die het polymerisatiecentrum "a" bezitten op fibrinemonomeren die de complementaire polymerisatiecentrum "A" bevatten. Deze techniek belooft vele toepassingen te hebben, zowel op farmacologisch gebied als bij de studie van afwijkingen van het fibrinogeenmolecuul. Met deze techniek zijn wij in staat geweest aan te tonen dat in het afwijkende fibrinogeen "Ales" het polymerisatiecentrum "a" niet functioneel is omdat het fragment D1 Ales niet hecht op normale fibrinemonomeren. Dit werk moet ons, samen met structuurstudies van het fibrinogeen "Ales" in staat stellen met enige verfijning het wezen van het polymerisatie centrum "a" van het fibrine te bepalen.
- 2) De interactie tussen fibrinogeen en biomaterialen te bestuderen dankzij het gebruik van antilichamen die reageren op conformatieveranderingen bij fibrinogeenadsorpties.
- 3) Direct fibrineafbraakproducten in het plasma te bepalen door het gebruik van anti D-néo antilichamen.

Deze nieuwe techniek kan heel belangrijke praktische consequenties hebben. Zij maakt een fundamentele verandering mogelijk bij de bepaling van fibrineafbraakproducten door

het uitschakelen van de vaak voorkomende overschatting die het gevolg is van de aanwezigheid van lage concentratie niet gepolymeriseerd fibrine. Ook hebben we kunnen aantonen dat, waar precipitatietechnieken met behulp van de gebruikte monoclonale antilichamen niet mogelijk zijn, de agglutinatatie van latexpartikels een goede alternatieve techniek is.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alkjaersig N., Davies A., Fletcher A. Fibrin and fibrinogen proteolysis products : comparison between gel filtration and SDS-polyacrylamide electrophoresis analysis. *Thromb. Haemost.*, 38 : 524, 1977.

2. Allington M.J. Fibrinogen and fibrin degradation products and the clumping of staphylococci by serum. *Br. J. Haematol.*, 13 : 550-567, 1967.

3. Alving B.M., Bell W.R., Evatt B.L. Fibrinogen synthesis in rabbits. Effect of all altered levels of circulating fibrinogen. *Am. J. Physiol.*, 232 : 478-484, 1977.

4. Avrameas S. Coupling of enzymes to protein with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigen and antibodies. *Immunochemistry*, 6 : 43-52, 1969.

5. Bachmann L., Schmitt-Fuman W., Hammel R., Lederer K. Size and shape of fibrinogen. Electron microscopy of the hydrated molecule. *Makromolekulare Chemie*, 176 : 2603-2618, 1975.

6. Barski G., Sorioul S., Cornefer T. Production dans des cultures (in vitro) de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère hybride. *C.R. Acad. Sci.*, 1960.

7. Belitser V.A., Varetskaja T.V., Malvena G.V. Fibrinogen-fibrin interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 154 : 367-375, 1968.

8. Belloc F., Hourdille P., Fialon P., Boisseau M.R., Soria J. Fibrinogen synthesis by isolated human megakaryocytes. *Thrombosis and haemostasis*, 50 : 1-18, 1983.

9. Bettelheim F.R., Bailey K. The products of the action of thrombin on fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta*, 9 : 578-579, 1952.

10. Bilezikian S.B., Nossel H.L., Butler Jr V.P., Canfield R.E. Radioimmunoassay of human fibrinopeptide B and kinetic of fibrinopeptide cleavage by different enzymes. *J. Clin. Invest.*, 56 : 438-445, 1975.

11. Blomback B., Blomback M. Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv. Kemi.*, 10 : 415-443, 1956.

12. Blomback B., Blomback M., Henschen A., Hessel B., Iwanaga S., Woods R. The N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Nature*, 218 : 130-134.

13. Blomback B., Yamashina I. On the N-terminal amino acids in fibrinogen and fibrin. *Arkiv. Kemi.*, 12 : 299, 1958.

14. Blomback B. Studies on the action of thrombotic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. *Arkiv. Kemi.*, 12, 321-335, 1958.

15. Blomback B., Blomback M., Edman P. et al. Human fibrinopeptides.

Isolation, characterization and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 115 : 371-396, 1966.

16. Blomback B., Blomback M., Hessel B. et al. Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature (Lond).*, 215 : 1445-1448, 1967.

17. Blomback B. Fibrinogen to fibrin transformation. In blood, clotting enzymology, Seegers W.H., ed. Academic Press New York, 4 : 143-215, 1967.

18. Blomback B., Hessel B., Hogg D. Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human fibrinogen. *Throm. Res.* 8 : 639-658, 1976.

19. Blomback B., Hessel B., Hogg D. et al. A two fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 275 : 501-508, 1978.

20. Blomback B., Hessel B., Steada M., Egberg N. Mechanism of fibrin formation and its regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 370 : 536-544, 1981.

21. Blomback M., Blomback B., Mammen E.F., Prasad A.S. Fibrinogen Detroit - a molecular defect in the N-terminal disulphide knot of human fibrinogen ? *Nature*, 218 : 134-137, 1968.

22. Boschetti E., Corthier G., Monsigny M. An improved chromatographic method for the purification of IgG and monoclonal antibodies. Special febs Meeting on cell function and differentiation. Athenes 1982, Abstract p 146.

23. Boucheix C., Mirshahi M., Soria J., Soria C., Perrot J.Y., Bernadou A., Rosenfeld C. Monoclonal antibodies for domains which are differentially exposed in fibrinogen, in fibrinogen degradation products or in fibrin degradation products. *Protides of Biological fluids.* H. Peeters ed. (Pergamm Press), 30 : 399-452, 1982.

24. Bouvier C., Gruedlinger J. Etude des phénomènes de coagulation et de fibrinolyse par une méthode simple d'enregistrement optique. *Schweiz. Med. Wschr.*, 93 : 1441-1443, 1963.

25. Budzynski A.Z., Marder V.J., Shainoff J.R. Structure of plasminic degradation products of human fibrinogen. Fibrinopeptide and polypeptide chain analysis. *J. Biol. Chem.*, 249 : 2294-2302, 1974.

26. Budzynski A.Z., Marder V.J., Parker M.E. et al. Antigenic markers on fragment DD, a unique plasminic derivative of human crosslinked fibrin. *Blood*, 54 : 794-804, 1979.

27. Budzynski A.Z., Olexa S.A., Pandya B.V. Fibrin polymerisation sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 408 : 301-314, 1983.

28. Buttin G., Cazenave P.A. L'hybridation des cellules lymphocytaires. *Bull. Inst. Pasteur*, 78 : 7-47, 1980.

29. Caen J., Larrieu M.J., Samama M. L'hémostase. Méthodes

d'exploration et diagnostic pratique. Exposition Scientifique (Paris), 1975.

30. Canfield R.E., Dean J., Nossel H.L. et al. Reactivity of fibrinogen and fibrinopeptide A-containing fibrinogen fragments with antisera to fibrinopeptide A. *Biochemistry* 15 : 1203-1209, 1976.

31. Chen R., Doolittle R.F. Isolation, characterization, and location of a donor-acceptor unit from cross-linked fibrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66 : 472-479, 1970.

32. Chen R., Doolittle R.F. Cross-linking sites in human and bovine fibrin. *Biochemistry*, 10 : 4486-4491, 1971.

33. Christensen V., Clemmensen I. Kinetic properties of the primary inhibitor of plasmin from human plasma. *Biochem. J.*, 163 : 389-391, 1977.

34. Cierniewski C., Plow E.F., Edgington T.S. An immunochemical homology between the A α and a DE complex-dependent site of the chains of fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 252 : 8917-8923, 1977.

35. Cierniewski C.S., Edgington T.S. Internalization of the amino terminal 1-78 sequence of the γ chain of native fibrinogen and exposure associated with catabolism and plasmin cleavage. *Biochim. Biophys. Acta*, 580 : 32-43, 1979.

36. Cierniewski C.S., Edgington T.S. Surface exposure of the NH₂-terminal regions of the B β chain of the human fibrinogen. *Thromb. Res.*, 14 : 747-764, 1979.

37. Collen D. Identification and some properties of a new fast reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.*, 69 : 209-216, 1976.

38. Corthier G., Boschetti E., Charley-Poulain J. Improved method for Ig purification from various animal species by ionic exchange chromatography. *J. Immunol. Methods*, 66 : 75-79, 1984.

39. Cottrell B.A., Doolittle R.F. The amino-acid sequence of a 27 residue peptide released from the α -chain carboxy-terminus during the plasmin digestion of human fibrinogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 754-761, 1976.

40. Cottrell B.A., Strong D.D., Watt K.W.K. et al. Amino acid sequence studies of the α chain of human fibrinogen. Exact location of crosslinking acceptor sites. *Biochem.*, 18 : 5405, 1979.

41. Daniel J.C. Utilisation de dispersions aqueuses de polymères. Colloque International sur les polymères à usage médical et pharmacologique. Montpellier, 1978.

42. Davies B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 : 404-427, 1964.

43. Doolittle R.F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin

conversion. Adv. Protein. Chem. 27 : 1-109, 1973.

44. Doolittle R.F., Watt K.W.K., Cottrell B.A. et al. Fibrinogen : A highly evolved regulatory agent for maintaining the integrity of the vertebrate circulatory system. In : Versatility of proteins, Li C.H. (Ed), New York Academic Press, p 393-411, 1978.

45. Doolittle R.F., Goldbaum D.M., Doolittle L.R. Designation of sequences involved in the "coiled-coil" interdomainal connections in fibrinogen : construction of an atomic scale model. J. Mol. Biol., 120 : 311-325, 1978.

46. Doolittle R.F., Laudano A.P. Synthetic peptide probes and the location of fibrin polymerization sites. Protides of Biological fluids. Peeters (Ed), (Pergamm Press) 28, 311-316, 1980.

47. Eckhardt T., Nossel H.L., Hurlet-Jensen A. et al. Measurement of desarginine fibrinopeptide B in human blood. J. Clin. Invest. 67 : 809-816, 1981.

48. Edgington T.S., Plow E.F. Conformational and structural modulation of the NH2-terminal regions of fibrinogen and fibrin associated with plasmin cleavage. J. Biol. Chem., 250, 3393-3398, 1975.

49. Engwall E., Carlsson H.E. Enzyme linked immunosorbent assay elisa. Ist International Symposium on immunoenzymatic technique. INSERM Symposium n 2. Feldmann Ed. (North Holland Publishing Company Amsterdam), 135-147, 1976.

50. Fair D.S., Edgington T.S., Plow E.F. Immunochemical mapping of the conformation of human fibrinogen. The γ 95-264 segment is sequestered in native fibrinogen but progressively exposed by plasmin cleavage. J. Biol. Chem. 256 : 8018-8023, 1981.

51. Fazekas de St Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. J. Immunol. Meth., 35 : 1-21, 1980.

52. Ferry J.D. The mechanism of polymerization of fibrin. Proc. Nat'l Acad. Sci., 38 : 566, 1952.

53. Finlayson J.S., Mosesson M.W. Heterogeneity of human fibrinogen. Biochem., 2, 42-46, 1963.

54. Fowler W.E., Erickson H.P., Hantgan R.R. et al. Cross-linked fibrinogen dimers demonstrate a feature of the molecular packing in fibrin fibers. Science 211 : 287-290, 1981.

55. Fowler W.R., Erickson H.P. Trinodular structure of fibrinogen. Confirmation by both shadowing and negative-stain electron microscopy. J. Mol. Biol. 134 : 241-245, 1979.

56. Francis C.W., Marder V.J., Martin S.E. Detection of circulating crosslinked fibrin derivatives by a heat extraction-SDS gradient gel electrophoretic technique. Blood, 54 : 1282-1295, 1979.

57. Francis C.W., Marder V.J., Barlow G.H. Plasmin degradation of

crosslinked fibrin. Characterization of new macromolecular soluble complexes and a model of their structure. *J. Clin. Invest.*, 66 : 1033-1043, 1980.

58. Francis C.W., Marder V.J. A molecular model of plasmic degradation of cross-linked fibrin. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 8 : 25-35, 1982.

59. Francis C.W., Marder V.J., Martin S.E. Plasmic degradation of cross-linked fibrin. 1. Structural analysis of the particulate clot and identification of new macromolecular soluble complexes. *Blood*, 54 : 456, 1984.

60. Francis C.W., Nachman R.L., Marder V.J. Plasma and platelet fibrinogen differ in α chain content. *Thromb. Haemost.*, 51, 1 : 84-88, 1984.

61. Francis C.W., Marder V.J., Martin S.E. Demonstration of a large molecular weight variant of the α chain of normal human fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 255 : 5595-5604, 1980.

62. Furlan M., Beck E.A. Plasmic degradation of human fibrinogen. I. Structural characterization of degradation products. *Biochem. Biophys. Acta*, 263 : 631-644, 1972.

63. Furlan M., Beck E.A. Plasmic degradation of human fibrinogen. II. Further characterization of fragment D. *Biochem. Biophys. Acta*, 310 : 205-216, 1973.

64. Gaffney P.J., Lane D.A., Kakkar V.V., Brasher M. Characterization of a soluble D dimer-E complex in crosslinked fibrin digests. *Thromb. Res.* 7 : 89-99 1975.

65. Gaffney P.J. The biochemistry of fibrinogen and fibrin degradation products. In : *Haemostasis : Biochemistry, Physiology and Pathology*, Ogston D., Bennett B. (Eds). John Wiley and Sons, pp 105-168, 1977.

66. Gaffney P.J., Mahmoud M. Influence of function on the recent evolution of fibrinogen. *J. Molecular Medicine*, 2 : 351-369, 1977.

67. Gaffney P.J., Whitaker A.N. Fibrin cross-links and lysis rates. *Thromb. Res.* 14 : 85-94, 1979.

68. Gaffney P.J., Joe F. The lysis of crosslinked human fibrin by plasmin initially a simple molecular complex D-dimer-E. *Thromb. Res.*, 15 : 673-687, 1979.

69. Gaffney P.J., Joe F., Mahmoud M. Giant fibrin fragments derived from crosslinked fibrin : structure and clinical implication. *Thromb. Res.* 20 : 647-662, 1980.

70. Gaffney P.J., Joe F., Mahmoud M., Spitz M. Crosslinked fibrin fragments : molecular characterization and assay procedures in plasma. *Progress in fibrinolysis*. Ed Davidson J.F., Churchill Livingstone, 5, 399-405, 1981.

71. Gardlund B., Kowalska-Loth B., Grondahl N.J., Blomback B. Plasmic degradation products of human fibrinogen. I. Isolation and characterization of fragments E and D, and their relationship to "disulfide knots". *Thromb. Res.* 1 : 371-388, 1972.
72. Gardlund B., Hessel B., Marguerie G., Murano G., Blomback B. Primary structure of human fibrinogen. *Eur. J. Biochem.*, 77 : 595-610, 1977.
73. Gati W.P., Straub P.W. Separation of both the and polypeptide chains of human fibrinogen into two main type which differ in sialic acid content. *J. Biol. Chem.*, 253 : 1315-1321, 1978.
74. Goldsmith G.M., Ziatz N.P., Robertson A.L. Studies on plasminogen activation and other proteases in subcultured human vascular cells. *Exp. Med. Path.* 35 : 257-264, 1981.
75. Gollwitzer R., Hahn E., Nowack H., Timpl R. Immunochemistry of bovine fibrinogen. I. Immunogenic activity and diversity of antigenic determinants of reduced and carboxymethylated and chains. *Immunochemistry*, 12 : 893-897, 1975.
76. Gollwitzer R., Timpl R. Isolation and immunological characterization of a disulfide loop region in human fibrinogen chain. *FEBS Lett* 58 : 269-272, 1975.
77. Gollwitzer F., Hafter R., Streifinger W., Graeff H. Comparative studies on FCB3 related antigen fibrinogen degradation products soluble fibrin monomer complexes and fibrinogen in patients with renal carcinoma. In fibrinogen-structure-functional aspects metabolism. W. de Gruyter Ed. (New York), 2 : 209-213, 1983.
78. Greym F., Leterrier F. *Biophysique générale et médicale*. Tome 1, 314-320, 1975. Flammarion, Paris.
79. Griffin J.H., Cochrane C.G. Recent advances in the understanding of contact activation reaction. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*. 4 : 254-273, 1979.
80. Hafter R., Graeff H. Homologues of fibrin X oligomers. In : *Fibrinogen - Recent Biochemical and Medical Aspects*. Henschen A., Graeff H., Lottspeich F. (Eds). Walter de Gruyter, (Berlin-Hawthorne, New York), 291-306, 1981.
81. Hall C.E., Slayter H.S. The fibrinogen molecule : Its size shape and mode of polymerization. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5 : 11-15, 1959.
82. Hantgan R., Mc Donagh J., Hermans J. Fibrin assembly. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 408 : 344-366, 1983.
83. Harfenist E.J., Canfield R.E. Degradation of fibrinogen by plasmin. Isolation of an early cleavage product. *Biochemistry*, 14 : 4110-4117, 1975.

84. Haverkate F., Timan G. Protective effect in calcium in the plasmin degradation of fibrinogen and fibrin fragments D. *Thromb. Res.*, 10 : 803-812, 1977.
85. Hawiger J., Niewiarowski S., Gurewich V., Thomas D.P. Measurement of fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clumping test. *Clin. Med.*, 75 : 93-108, 1970.
86. Hawiger J., Kloczewiar M., Timmons S. Interaction of fibrinogen with staphylococcal clumping factor and with platelets. *Ann. N.Y., Acad. Sci.*, 408 : 521-535, 1983.
87. Henschen A. S-sulfo-derivatives of fibrinogen and fibrin preparations and general properties. *Arkiv. Kemi.*, 22 : 1-12, 1964.
88. Henschen A. Number and reactivity of disulfide bonds in fibrinogen and fibrin. *Arkiv. Kem.*, 22 : 355-373, 1964.
89. Henschen A. Edman P. Large scale preparation of S-carboxymethylate chains of human fibrin and fibrinogen and the occurrence of chain variant. *Biochim. Biophys. Acta*, 63 : 351-367, 1972.
90. Henschen A. Disulfide bridges in the middle part of human fibrinogen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 : 1757-1770, 1978.
91. Henschen A., Lottspeich F., Hessel B. Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on a disulfide-containing internal peptide of the chain, obtained by plasmic digestion of fibrinogen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 359 : 1607-1610, 1978.
92. Henschen A., Lottspeich F., Topfer-Petersen E., Warbinek P. Primary structure of fibrinogen. *Thromb. Haemost.*, 41 : 662-670, 1979.
93. Henschen A., Lottspeich F., Southan C., Topfer-Petersen E. Human fibrinogen : sequences, sulfur bridges, glycosylation and some structural variants. In : "Protides of the biological fluids" Peeter H. (Ed) Pergamon press, 51-60, 1980.
94. Henschen A., Lottspeich F. Fibrinogen structure and fibrinolysis. *Haematologica*, 65 : 535-541, 1980.
95. Henschen A., Southan C., Soria J., Soria C., Samarra M. Structure abnormality of fibrinogen Metz and its relationship to the clotting effect. *Thromb. Haemost.*, 46 : 103, 1981.
96. Henschen A., Lottspeich F., Kehl M., Southan C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann. N.Y., Acad. Sci.*, 408 : 28-43, 1983.
97. Henschen A. On the structure of functional sites in fibrinogen. *Thromb. Res.*, suppl V, 27-39, 1983.
98. Hermans J. Models of fibrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 : 1189, 1979.
99. Hessel B. On the structure of the COOH-terminal part of the A α -chain of human fibrinogen. *Thromb. Res.*, 7 : 75-87, 1975.

100. Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.C., Collen D. Kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biochem.*, 257 : 2912-2919, 1982.
101. Hudry-Clergeon G., Paturol L., Suscillon M. Identification d'un complexe (D-D)... E dans les produits de dégradation de la fibrine bovine stabilisée par le facteur XIII. *Pathologie et Biologie*, 22 suppl : 47-53, 1974.
102. Iwanaga S., Blomback B., Grondahl N.J., Hessel B., Wallen P. Amino acid sequence of the N-terminal part of γ -chain in human fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta*, 160 : 280-283, 1968.
103. Jakobsen E., Ly B., Kierulf P. Incorporation of fibrinogen into soluble fibrin complexes. *Thromb. Res.*, 4 : 499, 1974.
104. Kehl M., Lottspeich P., Henschen A. Genetically abnormal fibrinogen releasing abnormal fibrinopeptides as characterized by high performance liquid chromatography. In : fibrinogen structure, functional aspects and metabolism. Haverkate F., Nieuwerkuize W., Henschen A., Straub P.W. (Eds), W. de Gruyter, 183-193, 1983.
105. Kessler C.M., Bell W.R. Stimulation of fibrinogen synthesis : a possible functional role of fibrinogen degradation products. *Blood*, 55 : 40-47, 1980.
106. Kohler G., Howe S.O., Milstein C. Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 6 : 292-295, 1976.
107. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495-497, 1975.
108. Kudryk B., Robinson D., Nette C., Hessel B., Blomback M., Blomback B. Measurement in human blood of fibrinogen, fibrin fragments containing the B β 15-42 sequence. *Thromb. Res.*, 25 : 277-291, 1982.
109. Kudryk B., Rohoza A., Amadi M., Chin J., Wiebe M. A monoclonal antibody with ability to distinguish between NH₂-terminal fragments derived from fibrinogen and fibrin. *Molecular Immunol.*, 20, 11 : 1191-1200, 1983.
110. Kwan Y.H., Haber E., Matsueda G.R. Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bond to human fibrin but not fibrinogen. *Science*, 222 : 1129-1132, 1983.
111. LaGamma K.S., Nossel H.L. The stability of fibrinopeptide B immunoreactivity in blood. *Thromb. Res.*, 12 : 447-454, 1978.
112. Lahiri B., Koehn J.A., Canfield R.E. et al. Development of an immunoassay for the COOH-terminal region of the gamma chains of human fibrin. *Thromb. Res.*, 1-15 ; 23 (1-2) : 103-112, 1981.

113. Laudano A.P., Doolittle R.F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerisation of fibrin monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 : 3085-3089, 1978.
114. Laudano A.P., Doolittle R.F. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. *Biochemistry*, 19 : 1013-1019, 1980.
115. Lehreer H.I., Van Vunakis H. Immunochemical studies on carboxypeptidase A. *Immunochemistry*, 2 : 255-262, 1965.
116. Lipinski B., Hawiger J., Jeljaszewicz J. Staphylococcal clumping with soluble fibrin monomer complex. *J. Exp. Med.*, 126 : 979-998, 1967.
117. Littlefield J. Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Sci.*, 145 : 700-710, 1964.
118. Lorand L. Fibrinopeptides. New aspects of the fibrinogen-fibrin transformation. *Nature*, 167 : 992-998, 1951.
119. Lorand L., Konishi K., Jacobsen M. Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature*, 194 : 1148-1149, 1962.
120. Marder V.J., Shulman N.R., Carroll W.R. The importance of intermediate degradation products of fibrinogen in fibrinolytic hemorrhage. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 53 : 156-159, 1967.
121. Marder V.J. Immunologic structure of fibrinogen and its plasmin degradation products. Theoretical and clinical considerations. In : *Fibrinogen*. Laki K. (Ed). Arnold, London, 339-357, 1968.
122. Marder V.J., Shulman N.R., Carroll W.R. High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. I. Physicochemical and immunological characterization. *J. Biol. Chem.* : 244 : 2111-2119, 1969.
123. Marder V.J., Shulman N.R., Carroll W.R. High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. III. Their NH₂ terminal amino acids and comparison with the NH₂ terminal disulphide knot. *J. Biol. Chem.*, 247 : 4775-4781, 1969.
124. Marder V.J., Budzynski A.Z. The structure of the fibrinogen degradation products. Progress in Hemostasis and Thrombosis. In : *Speat T. (Ed). Grune and Stratton*, 141-147, 1974.
125. Marquerie G. The fibrinogen-dependent pathway of platelet aggregation. *Ann. N.Y., Acad. Sci.*, 408 : 556-566, 1983.
126. Martinez S., Palascas J., Kwasniak D. Abnormal sialic acid content of the dysfibrinogenemia associated with liver disease. *J. Am. Invest.*, 61 : 535-538, 1978.
127. Marx J., Hudry-Clergeon G., Capet-Antonini F., Bernard L. Laser raman spectroscopy study of bovine fibrinogen and fibrin. *Biochim.*

Biophys. Acta, 578 : 107-115, 1979.

128. McKee P.A., Mattock P., Hill R.L. Subunit structure of human fibrinogen soluble fibrin, and cross-linked insoluble fibrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66 : 472-479, 1970.

129. Merskey C., Lalezari P., Johnson A.J. A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131 : 871-875, 1969.

130. Migeon B., Der Kalaustian V.M., Nyhan W.L. et al. X-linked H-G-PRT deficiency heterozygote has two clonal population. Science, 160 : 425-427, 1968.

131. Mihalyi E. Electrophoretic investigation of fibrin and fibrinogen dissolved in urea solutions. Acta Chemica Scand., 4 : 351, 1950.

132. Mirshahi M., Soria J., Soria C., Boucheix C., Perrot J.Y., Nieuwenhuisen W., Haverhate F., Bernadou P., Samama M., Rosenfeld C. Characterization of differently expressed epitopes in fibrinogen, fibrinogen degradation products and fibrin degradation products using monoclonal antibodies. Thromb. Haemost., 50, 1 : 301 (abstract), 1983.

133. Mosesson M.W., Finlayson J.S., Umfleet R.A. Human fibrinogen heterogeneity III. Identification of chain variants. J. Biol. Chem., 247 : 5223-5227, 1972.

134. Mosesson M.W., Finlayson J.S. The search for the structure of fibrinogen. In : Progress in Hemostasis and Thrombosis, Spaet T.H., Ed., III : 61-107, 1976.

135. Mosesson M.W. Fibrinogen heterogeneities. Ann. N.Y., Acad. Sc., 408 : 97-113, 1983.

136. Niewiarowski S., Prou-Wartelle O. Rôle du facteur contact (facteur Hageman) dans la fibrinolyse. Thromb. Diath. Haemost., 3 : 593-603, 1959.

137. Niewiarowski S., Kornecki E., Budzynski A., Morinelli T.A., Tuszyński G.P. Fibrinogen interaction with platelet receptors. Ann. N.Y., Acad. Sc., 408 : 536-555, 1983.

138. Nieuwenhuizen W., Haverkate F. Calcium binding regions in fibrinogen. C.R. Acad. Sc. (N.Y.), 408 : 92-96, 1983.

139. Nieuwenhuizen W., Vermond A., Hermans J. A calcium binding site in the central domain of human fibrinogen. Thromb. Haemost., 50, 1 : 186 (abstract), 1983.

140. Nilhen J.E. Split products of fibrinogen after prolonged interaction with plasmin. Thromb. Diath. Haemost., 18 : 89-100, 1967.

141. Nossel H.L., Younger L.R., Wilner G.D., Procupez J., Canfield R.E., Butler Jr V.P. Radio-immunoassay of human fibrinopeptide A. Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 68 : 2350-2353, 1971.

142. Nossel H.L., Chatpar R., Butler V.P. Jr, Canfield R.E. Radio-immunoassay of fibrinopeptide B. *Blood*, 40 : 955-959, 1972.
143. Nossel H.L., Yudelma I., Canfield R.E., Butler V.P. Jr, Spanodis K., Wilner G.O., Quresni G.O. Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J. Clin. Invest.*, 54 : 43-53, 1974.
144. Nossel H.L., Ti M., Kaplan K., Spanodis K., Soland , Butler V.P. The generation of fibrinopeptide A in clinical blood samples. Evidence for thrombin activity. *J. Clin. Invest.*, 58 : 1136-1144, 1976.
145. Nossel H.L., Wasser J., Kaplan K.L., La Gamma K.S., Yudelma I., Canfield R.E. Sequence of fibrinogen proteolysis and platelet release after intrauterine infusion of hypertonic saline. *J. Clin. Invest.*, 64 : 1371-1378, 1979.
146. Nossel H.L. Relative proteolysis of the fibrinogen B chain by thrombin and plasmin as a determinant of thrombosis. *Nature*, 291 : 165-168, 1981.
147. O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 10 : 4007-4021, 1975.
148. Olexa S.A., Budzynski A.Z. Binding phenomena of isolated unique plasmic degradation products of human cross-linked fibrin. *J. Biol. Chem.*, 254 : 4925, 1979.
149. Olexa S.A., Budzynski A.Z. Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 : 1374-1388, 1980.
150. Olexa S.A., Budzynski A.Z., Doolittle R.F., Cottrell B.A., Greene T.C. Structure of fragment E species from human cross-linked fibrin. *Biochemistry*, 21 : 6139-6145, 1981.
151. Pasqua J.J., Pizzo S. The role of ligand-ligand interactions in competition by fibrinogen and fibrin degradation products for fibrinogen binding to human platelets. *Biochem. Biophys. Acta*, 757 : 282-287, 1983.
152. Patscheke H., Worner P. Platelet activation detected by turbidimetric shape-change analysis. *Thromb. Res.*, 12 : 485-496, 1978.
153. Pizzo S.V., Schwartz M.L., Hill R.L., McKee P.A. The effect of plasmin on the submit structure of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 247 : 636-645, 1972.
154. Plow E.F., Edgington T.S. Molecular events responsible for modulation of neoantigenic expression : the cleavage-associated neoantigen of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 : 208-212, 1972b.
155. Plow E.F., Edgington T.S. Emergence of neoantigenic expressions during physiologic cleavage in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.*, 52 : 273-282, 1973a.

156. Plow E.F., Edgington T.S. An alternative pathway for fibrinolysis. I. The cleavage of fibrinogen by leukocyte platelets at physiologic pH. *J. Clin. Invest.*, 56 : 30-38, 1975.
157. Plow E.F., Edgington T.S. Unique immunochemical features and intracellular stability of platelet fibrinogen. *Thromb. Res.* 7 : 729-742, 1975.
158. Plow E.F., Edgington T.S. A cleavage-associated neoantigenic marker for a chain site in the NH₂-terminal aspect of the fibrinogen molecule. *J. Biol. Chem.* 250 : 3386-3392, 1975.
159. Plow E.F., Edgington T.S. Localization and characterization of the cleavage-associated neoantigen locus in the E domain of fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 254 : 672-678, 1979.
160. Plow E.F., Edgington T.S. Surface markers of fibrinogen and its physiologic derivatives revealed by antibodies probes. *Sem. Thromb. Haemost.*, 8 : 36-56, 1982.
161. Rylatt D.B., Blake A.S., Cottis L.E., Massingham D.A., Fletcher W.D., Masci P.P., Whitaker A.N., Elms M., Bunce I., Webber A.J., Wyatt D., Bundesen P.G. An immunoassay for human D dimer using monoclonal antibodies. *Thromb. Res.* 31 : 767-778, 1983.
162. Sasaki T., Page I.H., Shainoff J.F. Soluble complex of fibrinogen and fibrin. *Science*, 152 : 1069, 1966.
163. Schwartz M.L., Pizzo S.V., Hill R.L., McKee P.D. The effect of fibrin-stabilizing factor on the sub-unit structure of human fibrin. *J. Clin. Invest.*, 50 : 1506-1513, 1971.
164. Shainoff J.R., Page I.H. Cofibrins and fibrin-intermediates as modifiers of thrombin activity, in vivo. *Circulation Res.*, 8 : 1013, 1960.
165. Sharp J.J., Cassman K.G., Doolittle R.F. Amino acid sequence of the carboxy terminal cyanogen bromide fragment from bovine and human fibrinogen chains. *FEBS Letters*, 25 : 334-336, 1972.
166. Singer J.M., Plotz C.M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Amer. J. Med.*, 21 : 888-892, 1956.
167. Sobel J.H., Briken S., Ehrlich P. et al. Characterization of a crosslink-containing fragment derived from the polymer of human fibrin and its application in immunologic studies using monoclonal antibodies. *Thromb. Haemost.*, 46 : 240 (abstract), 1981.
168. Soria J., Soria C., Samama M., Coupier J., Girard M.L., Bousser J., Bilski-Pasquier G. Dysfibrinogenemies acquises dans les atteintes hépatiques. *Coagulation*, 3, 1 : 37-44, 1970.
169. Soria J., Soria C., Samama M., Poirot C., Kling C. Fibrinogen Troyes-fibrinogen Metz. Two new cases of congenital dysfibrinogenemia. *Thromb. Diath. Haemost.*, 27 : 619-633, 1972.

170. Soria J., Soria C., Ryckewaert J.J. A solid phase immuno-enzymological assay for the measurement of human fibrinopeptide A. *Thromb. Res.*, 20 : 425-435, 1980.
171. Soria J., Soria C., Fabiani P., Samama M. Determination of fibrinogen degradation products using anti fibrinogen serum and antipeptide E serum. *Thromb. Res.*, 3 : 339-343, 1979.
172. Soria J., Soria C., Boucheix C., Mirshahi M., Perrot J.Y., Bernadou A., Samama M., Rosenfeld C. Monoclonal antibodies that react preferentially with fibrinogen degradation products or with cross-linked fibrin split products. *Acad. Sci., N.Y.*, 409 : 665-666, 1983.
173. Soria J., Soria C., Boucheix C., Mirshahi M., Perrot J.Y., Bernadou A., Samama M. Immunochemical differentiation of fibrinogen fragment D or E, and cross-linked fibrin degradation products using monoclonal antibodies. In : *Fibrinogen, Structure, Functional aspects, Metabolism*. Havertake, Henschen, Nieuwenhuizen, Straub (Eds), Walter de Gruyter, 2 : 227-233, 1983.
174. Stanilawski M., Harel A., Mitard M., Pene J. Attachment of lymphoid cells to glutaraldehyde activated plastic cups : a convenient means for quantitative estimation of cytoplasmic and membrane Ig. *Provides of Biological Fluids*, (Peeters, Ed), Pergamon Press, 479-482, 1980.
175. Straub P.W. A study of fibrinogen production by human liver slices in vitro by immunoprecipitin method. *J. Clin. Invest.*, 42 : 130-135, 1963.
176. Straub P.W., Kuyas C., Herberli A. The plasma fibrinogen fraction with elevated sialic acid. Content and elongated chains. *Ann. N.Y., Acad. Sc.*, 408 : 114-117, 1983.
177. Strong D.D., Laudano A.P., Hawiger J., Doolittle R.F. Isolation characterization and synthesis of peptides from human fibrinogen that block the staphylococcal clumping reaction and construction of a synthetic clumping particule. *Biochemistry*, 21 : 1414-1420, 1982.
178. Takagi T., Iwanaga S. Polypeptide chain involved in the crosslinking of stabilized bovine fibrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38 : 129-136, 1970.
179. Takagi T., Doolittle R.F. Amino acid sequence studies on plasmin-derived fragments of human fibrinogen. Amino-terminal sequences of intermediate and terminal fragments. *Biochemistry*, 14 : 940-946, 1975.
180. Takagi T., Doolittle R.F. Amino acid sequence studies of the chain of human fibrinogen : location of four plasmin attack points and a covalent crosslinked site. *Biochemistry*, 14 : 5149-5156, 1975.

181. Tanswell P., Stan-Lotter H., Gollwitzer R., Timpl R. Immunochemistry of bovine fibrinogen-III. Localization of two antigenic determinants in fibrinopeptide B. *Immunochemistry*, 14 : 277-281, 1977.
182. Teger-Nilsson A.C. Degradation of human fibrinopeptide A and B in blood serum in vitro. *Acta Chem. Scand.*, 22 : 3171-3182, 1968.
183. Topfer-Petersen E., Henschen A. Carbohydrate carrying peptide isolated from bovine fibrin and chain. *Thromb. Res.*, 11 : 881-892, 1977.
184. Watt K.W.K., Takagi T., Doolittle R.F. Amino acid sequence of the chain of human fibrinogen. *Biochemistry*, 18 : 68-76, 1979.
185. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406-4412, 1969.
186. Wijngarras G., Kluft C., Groeneveld E. Demonstration of urokinase related fibrinolytic activity in human plasma. *J. Haemost.*, 51 : 165-169, 1983.
187. Wilner G.D., Nossel H.L., Canfield R.E. et al. Immunochemical studies of human fibrinopeptide A using synthetic peptide homologues. *Biochemistry*, 15 : 1209-1213, 1976.
188. Wilner G.D., Thomas D.W., Nossel H.L. et al. Immunochemical analysis of rabbit antihuman fibrinopeptide B antibodies. *Biochemistry*, 18 : 5078-5082, 1979.
189. Wilner G.D., Mudd M.S., Hsien K.H., Thomas D.W. Monoclonal antibodies to fibrinogen : modulation of determinants expressed in fibrinogen by chain crosslinking. *Biochemistry*, 21 : 2687-2692, 1982.
190. Wolberg G., Liu C.T., Adler F.L. Passive hemagglutination. II. Titration of antibody against determinants unique for aggregated denatured bovine serum albumin and further studies on gelatin. *J. Immunol.*, 105 : 797-801, 1970.
191. Wolfenstein-Todel C., Mosesson M.W. Human plasma fibrinogen heterogeneity : evidence for an extended carboxy-terminal sequence in a normal chain variant ('). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 5069-5073, 1980.
192. Wolfenstein-Todel C., Mosesson M.W. Carboxy-terminal aminoacid sequence of a human fibrinogen chain variant ('). *Biochemistry*, 20 : 6146-6149, 1981.
193. Wolters G., Kuipers L., Kacaki J., Schuurs A. Solid phase enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. *J. Clin. Path.*, 29 : 873-879, 1976.

Massoud MIRSHAHI est né le 19 Mai 1954 à Nishabour (Iran), il a fait ses études secondaires à Mashad (Iran) et a passé le baccalauréat Sciences Naturelles en 1973. Il a entrepris ensuite ses études médicales qu'il a poursuivies à Mashad de 1973 à décembre 1979. A cette époque, il a été Interne des Hôpitaux de Mashad. En Janvier 1980 il est venu à Paris, tout d'abord dans le Service du Professeur Mathé, où il a suivi l'enseignement du Certificat d'Etudes Supérieures de Cancérologie Générale et Expérimentale et a obtenu le diplôme correspondant en 1982. Puis, il a suivi le Certificat d'Etudes Supérieures d'Immunologie Générale du Professeur Homberg en 1983 et a obtenu le diplôme correspondant. Enfin, durant l'année universitaire 1983-1984 il a suivi avec succès les études de 3e cycle de Biochimie et Physiologie de l'Hémostase organisées par le Professeur J. Caen et le Professeur G. Tobelem, ainsi que les études de 3e cycle d'Immunogénétique et d'Immunopathologie organisées par le Professeur Dausset et le Professeur Brouet.

Au cours de ses études il a été contacté par le Docteur C. Boucheix qui l'a introduit dans le laboratoire du Professeur Bernadou à l'Hôtel-Dieu. Il a travaillé dans le domaine de l'immunologie du cancer. Parallèlement sous la direction de J. et C. Soria, il s'est intéressé au problème de la coagulation et a entrepris la préparation d'anticorps monoclonaux contre le fibrinogène et dont les applications pratiques sont nombreuses. Il a également travaillé dans le domaine de l'immunopathologie de l'oeil où il réalise des travaux concernant l'antigène S de la rétine, sous la direction du Docteur J.P. Faure.